



Facultad de
Ciencias de la Salud
y del Deporte - Huesca
Universidad Zaragoza



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Trabajo Fin de Grado

TRANSCRIPTÓMICA DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA INDUCIDA EN CERDOS A TRAVÉS DE LA DIETA

AUTOR

Manuel Macías Herranz

TUTORES

Jesús de la Osada García
Roberto Martínez Beamonte

JUNIO 2021

RESUMEN

Este Trabajo Final de Grado parte de las muestras de un estudio que se realizó utilizando cerdos a los que se les alimentó con una dieta enriquecida en grasa saturada, colesterol, fructosa y ácido cólico. A los 2 meses de la intervención dietética desarrollaron hígado graso. Se han analizado los RNAs hepáticos antes de la intervención y a los 2 meses de esta para ver qué cambios a nivel del transcriptoma están implicados en el desarrollo de la NAFLD en este modelo animal análogo al humano.

Se han procesado las muestras para extraer su RNA, estos sirvieron para analizar los transcriptomas mediante RNAseq. Los resultados de los 3 pools de muestras, fueron analizados para ver el patrón de genes implicados. Aquellos genes con cambios de expresión más relevantes se confirmaron individualmente por RT-qPCR y se analizaron sus expresiones antes y después de la intervención dietética, para ver las diferencias debidas a la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis hepática). Se estudió mediante inmunohistoquímica la cantidad de la proteína inflamatoria CD68 en las muestras de inicio o control y en las muestras de tratamiento o esteatosis. Se analizaron una serie de parámetros bioquímicos séricos implicados en el desarrollo de esta patología.

Los animales desarrollaron NAFLD en tras 2 meses de intervención dietética confirmándose con la histología hepática. Además, se confirmó inflamación mediante la detección inmunohistoquímica de la proteína CD68 propia de los macrófagos. Los genes *MT1D*, *GPNMB*, *SQLE*, *ENTPPL*, *LOC100520753*, *LOC102166944*, *MOXD1*, *NANOS1*, *PEPB4*, *SLC51B* y *LGAL* S3 mostraron cambios estadísticamente significativos tras la intervención dietética tanto en el RNAseq como en la RTqPCR. Los cuerpos cetónicos junto con la fosfatasa alcalina podrían convertirse en posibles nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de esta enfermedad metabólica.

ABSTRACT

This Final Degree Project starts with the samples of a study that was carried out using pigs that were fed a diet enriched in saturated fat, cholesterol, fructose and colic acid. Two months after the dietary procedure, they developed fatty liver. Hepatic RNAs have been analyzed prior to the intervention and 2 months after the intervention to see what transcriptome-level changes are involved in the development of NAFLD in this human-analogous animal model.

The samples have been processed to extract their RNA, which was used to analyze transcriptomes using RNAseq. The results of 3 samples pools were analyzed to see the pattern of genes involved. Those genes with more relevant expression changes were confirmed individually by RT-qPCR and their expressions were analyzed before and after the dietary intervention, to see the differences due to the accumulation of fat in the liver (hepatic steatosis). The amount of the inflammatory protein CD68 in the initiation or control samples and in the treatment or steatosis samples was studied using immunohistochemistry. Serum biochemical parameters involved in the development of this pathology were analyzed.

The animals developed NAFLD after 2 months of dietary intervention confirmed with hepatic histology. Furthermore, inflammation was confirmed by the immunohistochemical detection of macrophage-specific protein CD68. The *MT1D*, *GPNMB*, *SQLE*, *ENTPPL*, *LOC100520753*, *LOC102166944*, *MOXD1*, *NANOS1*, *PEPB4*, *SLC51B* and *LGAL S3* genes showed statistically significant changes after dietary intervention in both RNAseq and RTqPCR. Ketonic bodies along with alkaline phosphatase could become possible new biomarkers for the early diagnosis of this metabolic disease.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. Introducción.....	4
1.1. ¿Qué es la esteatosis hepática?.....	4
1.2. Clasificación de la esteatosis hepática.....	4
1.3. Epidemiología.....	4
1.3.1. Papel metabólico del hígado y su disfunción en la NAFLD.....	5
1.4. Etiología.....	5
1.5. Patogenia.....	6
1.5.1 Rutas implicadas en el inicio de la NAFLD (evento inicial).....	6
1.5.2. Estrés oxidativo e Inflamación (segundo evento).....	7
1.6. Transcriptómica.....	8
1.7. El cerdo como modelo animal de NAFLD.....	8
1.8. Justificación.....	10
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo general.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. Material y métodos.....	11
3.1. Animales.....	11
3.2. Dietas.....	12
3.3. Extracción y purificación de RNA.....	13
3.4. Cuantificación del RNA y determinación de su calidad.....	15
3.5. Análisis mediante RNAseq.....	16
3.6. Retrotranscripción.....	17
3.7. Optimización de reacciones para RT-qPCR.....	18
3.8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR).....	18
3.8.1. ¿Qué es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)?.....	18
3.8.2. ¿Qué es la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (RT-qPCR)?.....	19
3.8.3 Aplicaciones de la RT-qPCR.....	19
3.9. Análisis de la expresión génica (Método $2^{\Delta\Delta C_t}$).....	21
3.10. Análisis histopatológico del % de LD.....	23
3.11. Inmunohistoquímica de la proteína CD68.....	24
3.11. Análisis de parámetros bioquímicos séricos.....	26
3.12. Tratamiento de datos.....	27
4.Resultados.....	27

4.1. Resultados parámetros bioquímicos	27
4.2 Resultados de RNAseq	28
4.3. Resultados de la optimización de reacciones para RT-qPCR	29
4.4. Resultados RT-qPCRs	30
4.5 Resultados porcentaje de gotas lipídicas (LD%).....	31
4.6. Resultados de la inmunohistoquímica de la proteína CD68	32
4.7. Resultados estudio de correlación	33
5.Discusión	35
6.Conclusiones.....	41
7. Bibliografía y Webgrafía	42

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AGL	Ácidos grasos libres
ALP	Alanina aminotransferasa
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Aspartato aminotransferasa
AP	Anatomía patológica
BLAST	Basic local alignment search tool
CD68	Proteína CD68
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CEAEA	Comisión ética asesora para la experimentación animal
CIBA	Centro de investigación biomédica de Aragón
cLDL	Colesterol LDL
Ct	Ciclo de cuantificación
CYP51	Citocromo P51 (familia de citocromo P450)
DEPC	Dietil policarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNL	Lipogénesis <i>de novo</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENTPPL	Etanolamina fosfato fosfoliasa
GAPdh	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GEO	Gene Expression Omnibus
GGT	Gammaglutamil transpeptidasa
GPNMB	Glicoproteína transmembrana de melanoma B no metastásico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
INF	Interferón
KB	Cuerpos cetónicos

LD	Gotas lipídicas
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LGALS3	Galectina 3
MIQUE	Información mínima para la publicación de experimentos de RT-qPCR
MOXD1	Monoxigenasa D1
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT1D	Metalotioneina-1E
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NANOS1	Nanos C2HC-tipo dedo de Zn 1
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NGS	Secuenciación de nueva generación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPB4	Fosfatidiletanolamina binding protein 4
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
RNasas	Nucleasas de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SAEA	Servicio para la experimentación animal
SD	Desviación estándar
SLC25A25	Transportador de solutos 25A25
SLC51B	Transportador de solutos 51B
SQLE	Escualeno epoxidasa
TBE	Tris-borato-EDTA
TFG	Trabajo final de grado
TG	Triglicéridos
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UBA52	Ubiquitina 52
UV	Ultravioleta

VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ΔCt	Δ Ciclo de cuantificación
$\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta$ Ciclo de cuantificación

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Qué es la esteatosis hepática?

La esteatosis hepática o enfermedad de hígado graso, es una patología multifactorial caracterizada por la acumulación de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos, formando gotas lipídicas, en el citoplasma de los hepatocitos (Gonzalo Rodríguez, 2012).

1.2. Clasificación de la esteatosis hepática

Existen 2 tipos de esteatosis hepática:

- La esteatosis hepática alcohólica, provocada por un exceso de consumo de alcohol etílico.
- La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), se trata de una enfermedad multifactorial caracterizada por presentar al menos un 5% de los hepatocitos infiltrados de grasa, en la cual se ha descartado de manera certera el consumo de etanol o derivados como posible causa. Será a esta entidad clínica a la que haga referencia a lo largo de todo el trabajo. Esta patología es reversible, sin embargo, si no se trata a tiempo puede progresar hacia otras entidades clínicas más complejas e irreversibles como la esteatohepatitis (NASH), caracterizada por la inflamación, además de la esteatosis, con o sin presencia de fibrosis, y que puede evolucionar hacia la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (Loomba et al., 2021).

1.3. Epidemiología

La NAFLD presenta una prevalencia variable en función de cada localización geográfica. La prevalencia más elevada tuvo lugar Medio Oriente y Sudamérica con un 31,79% y 32% respectivamente y la más baja en África con un 13,48% (Younossi et al., 2019). Sin embargo, y a modo global podemos afirmar que la NAFLD afecta a 1000 millones de individuos y que su prevalencia mundial es de entorno al 25%, tratándose por tanto de un verdadero problema de salud pública. En la actualidad diversos estudios nos confirman que la NAFLD es la enfermedad hepática de mayor prevalencia en los países occidentales pudiendo ser en los próximos 10-20 años la primera causa de trasplante hepático en estas sociedades (Charlton et al., 2011).

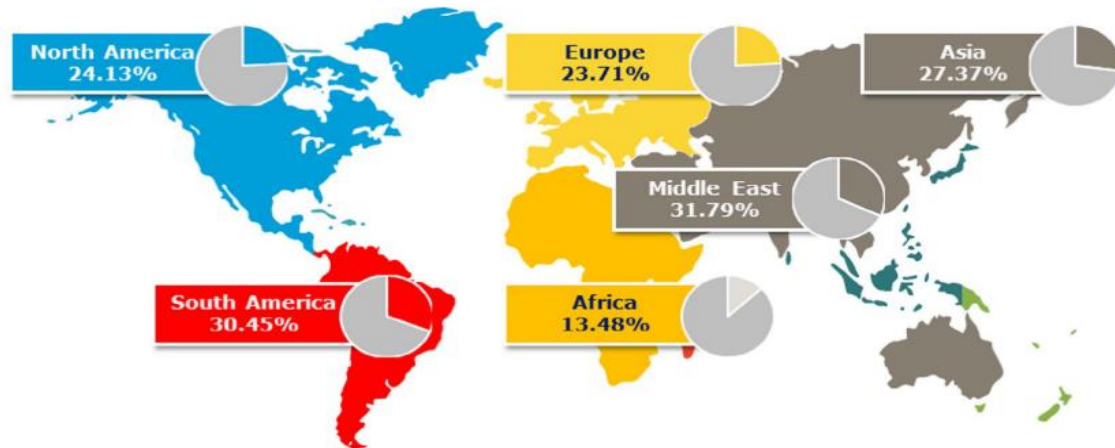


Figura 1. Prevalencia mundial de NAFLD. Adaptado de Younossi (Younossi et al., 2019)

1.3.1. Papel metabólico del hígado y su disfunción en la NAFLD

El hígado es un órgano capaz de almacenar las calorías excedentes de la dieta en forma de grasa en los periodos de abundancia, para posteriormente poder hacer uso de ella en los periodos de escasez de alimentos, exportándola al resto de tejidos del organismo. Esto era lo que sucedía durante la prehistoria y lo que ha permitido entre otros factores la evolución de la especie humana. En la actualidad el consumo de un exceso de calorías y la mala calidad de la dieta, unido al creciente sedentarismo, hacen que esta grasa no se libere adecuadamente del hígado. Esta acumulación lipídica transforma al hígado en un tejido muy similar al tejido adiposo blanco presente en otras localizaciones corporales. Los hepatocitos pierden su forma poligonal característica transformándose en unas células mucho más esféricas, conocida como balonización de los hepatocitos y con una gran gota lipídica central que llega incluso a rechazar el núcleo y los orgánulos subcelulares a la periferia. Sin embargo, el depósito de un exceso de grasa en las células hepáticas se relaciona con una serie de procesos fisiopatológicos de etiología no del todo conocida, en los que la inflamación es el pilar fundamental de estos (Martínez Soriano, 2017).

1.4. Etiología

La NAFLD está asociada con una gran cantidad de agentes causales sin embargo tratando de simplificar existen 2 formas principales, la NAFLD primaria asociada a la obesidad, dislipemia, diabetes y al síndrome metabólico (sobre la que me centraré), y la NAFLD secundaria asociada a otras causas como algunos fármacos (por ejemplo amiodarona, corticoesteroides, estrógenos, tetraciclinas...), la Nutrición parenteral total, la cirugía bariátrica, algunas metabolopatías como

por ejemplo la enfermedad de Wilson, la lipodistrofia congénita o adquirida (Gonzalo Rodríguez, 2012).

1.5. Patogenia

Existen 2 eventos importantes en el desarrollo fisiopatológico de esta enfermedad como ya explicó Day en 1998. El primero de los mismos hace referencia a las lesiones hepáticas causadas por un exceso de ácidos grasos libres, que son almacenados en forma de triglicéridos. Estas alteraciones iniciales van a ser las desencadenantes del segundo evento, caracterizado por la presencia del estrés oxidativo y por una gran producción de citoquinas proinflamatorias (Day & James, 1998).

1.5.1 Rutas implicadas en el inicio de la NAFLD (evento inicial)

El hígado juega un papel fundamental gestionando una gran cantidad de rutas metabólicas muy diversas en el organismo. En cuanto al metabolismo lipídico en el hepatocito, conocemos que los ácidos grasos no estrificados llegan al hígado procedentes de la lipólisis en el adipocito, por la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres por acción de las lipasas adipocitarias, procedentes de las grasas de la dieta o bien de la lipogénesis de novo (DNL) (es decir la transformación de los excedentes de carbohidratos en lípidos). Por otra parte, los AGL pueden consumirse en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal para la producción de energía celular, reesterificarlos y empaquetarlos en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) para la exportación, y/o excretarse en forma de ácidos biliares. Estos procesos en un organismo en estado fisiológico permanecen en equilibrio (Martínez Soriano, 2017).

Cuando la captación (lipólisis en el adipocito y grasa de la dieta) y la síntesis (DNL) de lípidos predomina sobre la β -oxidación, la exportación de VLDLs y/o la excreción biliar, se va a producir un desequilibrio que va a dar lugar a un acúmulo de grasa en el hígado y finalmente a la NAFLD (Martínez Soriano, 2017). Los mecanismos que explican estos acontecimientos parecen estar relacionados con la resistencia a la inulina presente en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2, dislipemia, obesidad y síndrome metabólico. En el adipocito, esta insulino-resistencia provoca una inhibición en la regulación de la lipasa lo cual está detrás de la enorme cantidad de ácidos grasos libres que son liberados. El exceso de estos ácidos grasos libres que llegan al hígado y que son reesterificados a triglicéridos van a ser el principal mecanismo detrás de la NAFLD. Otros mecanismos también implicados en la génesis de esta enfermedad. Uno de ellos sería el incremento de insulina en sangre (hiperinsulinemia) que presenta un efecto inhibitorio sobre la

enzima carnitina palmitoil transferasa implicada en la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos lo cual, va reducir la tasa de oxidación lipídica. Esta hiperinsulinemia también está detrás de una disminución en la síntesis de la apolipoproteína B-100, lo cual explicaría la disminución de liberación de VLDLs citada anteriormente. Finalmente, el exceso de consumo de mono y disacáridos, concretamente fructosa, sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa presentes de forma muy ubicuitaria en los alimentos ultraprocesados puede incrementar la DNL exacerbando más la NAFLD (Herrera Marcos, 2019).

1.5.2. Estrés oxidativo e Inflamación (segundo evento)

El hepatocito estatósico es muy sensible a las especies reactivas del oxígeno (ROS) por lo que el estrés oxidativo y del retículo endoplasmático (RE), las citoquinas y adipoquinas proinflamatorias, y la disfunción mitocondrial presentes en la progresión de esta patología hacia la inflamación y la fibrosis. La oxidación de los AGL produce una gran cantidad de peróxido de hidrógeno que al reaccionar con el hierro genera radicales hidroxilos muy reactivos. El exceso de estas especies reactivas del oxígeno (ROS) hace que los sistemas antioxidantes endógenos como el glutatión se deplecionen, dando lugar a una situación de gran estrés oxidativo y al fenómeno de la peroxidación lipídica. Sabemos que el estrés oxidativo va a activar la vía del factor nuclear κB (NF- κB) promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias, además los productos finales de la lipoperoxidación como el malonildialdeído y el 4-hidroxialquenal, tienen una acción quimiotáctica activando más a citoquinas proinflamatorias y estimulando a las células estrelladas aumentando así el grado de fibrosis en el hígado (Martínez Soriano, 2017).

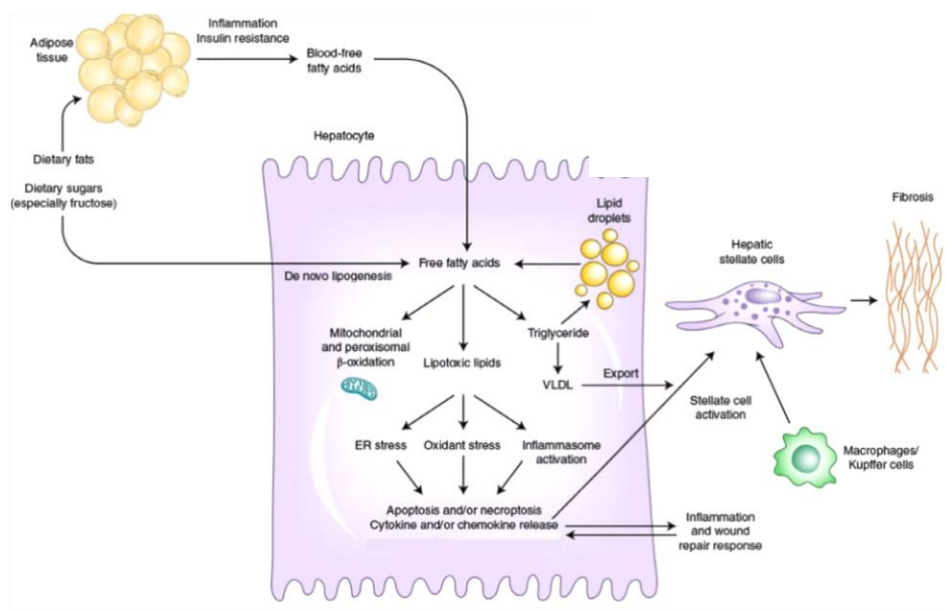


Figura 2. Patogénesis de la NAFLD. Adaptado de Friedman (Friedman et al., 2018)

1.6. Transcriptómica

En las últimas décadas las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica...) están cambiando la bioquímica y la biología molecular clásica. Estas nos están permitiendo estudiar los genes y sus diversos productos de expresión de una forma cada vez más sencilla y económica asociadas a la bioinformática y al big data, necesarios para la interpretación de la multitud de resultados que generan. Todos estos elementos combinados están suponiendo una revolución tecnológica de gran aplicabilidad en el estudio de las enfermedades humanas, dentro de las cuales podemos englobar varias enfermedades relacionadas con la nutrición y el metabolismo (Herrera Marcos, 2019).

La transcriptómica centra su interés en el estudio del transcriptoma, es decir es el conjunto de moléculas de RNA mensajero (mRNA) y de RNA no codificante presente en una célula o tejido concreto. Inicialmente la transcriptómica estaba muy limitada pudiéndose realizar únicamente estudios cualitativos o semicuantitativos de genes concretos. No fue hasta la aparición de las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (RTq PCR) y de los *microarrays* cuando este panorama comenzó a cambiar con el aumento del número de transcritos que podían ser estudiados. Sin embargo, no ha sido hasta la reciente aparición de las denominadas técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), como son la secuenciación del genoma (DNA) y la secuenciación del transcriptoma (RNA) cuando se ha dado un giro de 180 grados en este campo de la ciencia (Cos, 2010). Pudiéndose secuenciar genomas y transcriptomas completos de individuos en pocos días y con un coste económico cada vez menor. Así otras tecnologías de menor capacidad como los chips de DNA o *microarrays* van a quedar cada vez más desplazados por estas tecnologías modernas de gran eficiencia. La NAFLD es una de las enfermedades metabólicas que más se va a beneficiar de esta nueva perspectiva como se puede apreciar en este Trabajo Final de Grado (TFG).

1.7. El cerdo como modelo animal de NAFLD

Los modelos animales en investigación biomédica son necesarios para entender los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades, para descubrir y validar nuevos tratamientos, así como para estudiar la farmacodinámica y los efectos tóxicos de estos. En la actualidad se utilizan como modelos a *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, o los roedores y lagomorfos que son útiles para algunos estudios genéticos sencillos, aunque no presentan la complejidad fisiológica de los humanos. Este es el motivo fundamental por el cual la investigación traslacional necesita hacerse con nuevos biomodelos, que reproduzcan de una manera lo más parecida posible

la evolución, la clínica de enfermedades humanas, así como las alteraciones, moleculares, citológicas y tisulares (Bassols et al., 2014).

El cerdo (*Sus scrofa*) es un animal que presenta una gran similitud genética, anatómica y fisiológica con el ser humano mucho mayor que otras especies. Ello ha permitido poder utilizar este animal como modelo para el estudio de complejas enfermedades que afectan a los humanos. Las nuevas tecnologías como la ingeniería genética y la transgénesis están permitiendo generar nuevos modelos que presentan una semejanza en el desarrollo de estas enfermedades humanas todavía mayor. Ya existen algunos modelos de cerdo transgénico como es el caso el cerdo knock-out para el gen que codifica la enzima 1,3 galactosiltransferasa implicada en el rechazo hiperagudo que aparece tras trasplantar un órgano de cerdo en un primate superior como el humano (Gadea & García-Vázquez, 2010). La investigación en este campo ampliará considerablemente las posibilidades de estudio de múltiples patologías humanas.

Dentro de las diferentes enfermedades que podemos estudiar utilizando el cerdo como modelo hay que destacar los trasplantes y las enfermedades metabólicas, como el síndrome metabólico y su expresión hepática y más concretamente la NAFLD en la que se centra el trabajo.

En el caso de los trasplantes está ofreciendo muchas ventajas en estudios sobre procedimientos concretos de trasplante, preservación de órganos y estudio de mecanismos de isquemia-reperfusion (Bassols et al., 2014). Toda variación en los procedimientos actuales de trasplante de órganos debe ser además previamente validada en un modelo animal grande análogo al humano antes de proceder a llevarlos a la práctica clínica. En los xenotrasplantes el cerdo está ganando una gran relevancia, puesto que puede ser una gran fuente de suministros futuros de tejidos para el campo de la ingeniería tisular y la generación de órganos bioartificiales. Ya en la actualidad algunos tejidos como válvulas cardíacas son obtenidos de estos animales para implantar en los pacientes.

En relación a la NAFLD, la prevalencia de esteatosis en los hígados donados para trasplante está aumentando considerablemente. En el año 1998 esta prevalencia se encontraba entre el 9 y el 26%, mientras que en el año 2006 se elevó a la alarmante cifra del 51%. Hoy en día es muy probable que estas cifras sean bastante superiores (Jamieson et al., 2011). Esta es una circunstancia seria que puede hacer que los órganos no funcionen correctamente y por tanto sean rechazados para trasplantar. La reducción del porcentaje de grasa en estos hígados podría expandir el número de posibles donantes. Con objeto de reducir el porcentaje de esteatosis de estos órganos se han diseñado diversas tecnologías científicas como un dispositivo provisto de una aguja con un electrodo para medir la impedancia bioeléctrica y por tanto el porcentaje de esteatosis, similar a la bioimpedancia para determinar la composición corporal empleada por los nutricionistas en consulta, hasta un equipo de perfusión normotérmica para preservar estos órganos desde su

extracción hasta su implante en el receptor, mejorando también la esteatosis de los mismos mediante el uso de unas soluciones de composición especial, que son capaces de reducir el contenido de triglicéridos hepáticos permitiendo el trasplante de órganos subóptimos, que sin este tratamiento tendrían que desecharse. Para llevar a cabo estos experimentos sobre reducción del porcentaje de esteatosis, previos a su aplicación en humanos, es necesario contar con modelos animales grandes y complejos como el cerdo que confirmen los resultados satisfactorios obtenidos en modelos más pequeños como las ratas.

1.8. Justificación

La justificación de este trabajo se sustenta en la necesidad de aumentar el estudio de una patología cada vez más prevalente como es la esteatosis, la cual diversos estudios asocian en un porcentaje importante a factores exógenos. Dentro de estos factores los más destacables serían la dieta y la falta de actividad física. El sedentarismo se está apoderando cada vez más de nuestras vidas y poco a poco el patrón dietético occidental está apartando hacia un lado e incluso sustituyendo nuestra dieta mediterránea, haciendo del síndrome metabólico y la NAFLD, su manifestación hepática, un problema de salud pública con necesidad de intervenir en las próximas décadas. Afortunadamente se sabe que tanto la dieta como el ejercicio físico son potencialmente modulables, haciendo de estos la mejor forma de atajar esta patología en progresión.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar el efecto nutrigenómico de la dieta estatósica como un inductor de la NAFLD en un modelo animal grande.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar NAFLD en los cerdos mediante una dieta preparada *ad hoc*.
- Caracterizar anatomopatológicamente el estatus de la enfermedad.
- Buscar nuevos genes implicados en la NAFLD mediante el empleo de secuenciación de nueva generación (NSG)
- Confirmar los resultados de la técnica anterior mediante el empleo de la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

- Analizar los resultados para poder establecer un potencial biomarcador diagnóstico de la NAFLD.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

Este trabajo final de grado está basado en un estudio llevado a cabo por investigadores del grupo “Dieta Mediterránea y potencial nutracéutico” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular la Universidad de Zaragoza, en él se sustentan 3 tesis doctorales, una de ellas dirigida por el Catedrático del Departamento de Bioquímica Jesús de la Osada García y las otras 2 por él Catedrático del Departamento de Cirugía Antonio Tomás Güemes Sánchez. En el estudio se utilizaron 12 cerdos machos cruce de las razas Large White x Landrace con un peso aproximado de 42 kg los cuales fueron alojados en el estabulario del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal (SAEA) situado en la Facultad de Veterinaria. Tras la recepción de los cerdos en las instalaciones se les tomaron muestras de sangre y permanecieron en un periodo de adaptación de 30 días. Durante este tiempo los cerdos fueron alimentados con una dieta estándar. Al día siguiente se procedió a la toma ecoguiada de biopsias de los hígados mediante una aguja de tipo tru-cut. A partir de ese día comenzó el periodo de esteatosis, en el cual los cerdos fueron alimentados con una dieta estatósica que posteriormente comentaré con detalle. Este periodo duró 60 días momento en el cual los cerdos fueron trasladados hasta los quirófanos del hospital clínico veterinario. Una vez allí fueron anestesiados se tomaron las muestras de hígado a través de una laparotomía media, y finalmente los cerdos fueron eutanasiados. Todos los procedimientos llevados a cabo sobre los animales fueron previamente evaluados y autorizados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (CEAEA) de la Universidad de Zaragoza.

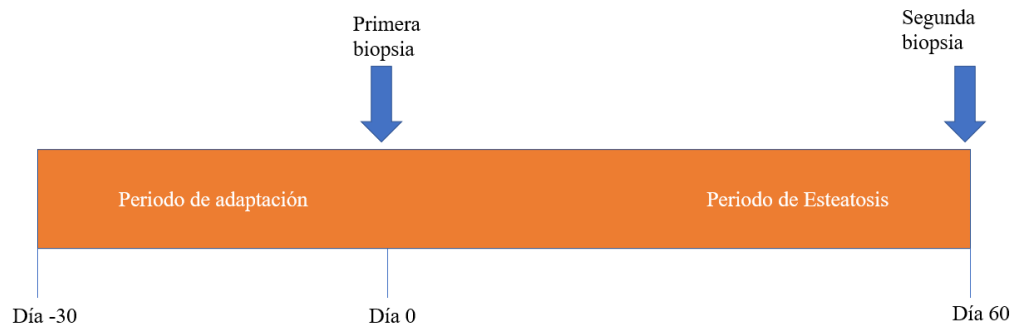


Figura 3. Fases del estudio de progresión de NAFLD

3.2. Dietas

En relación con las dietas, la primera de ellas, dieta control, fue suministrada por CADEBRO (Casetas, Zaragoza, España). Esta dieta con la que fueron alimentados los cerdos durante el periodo de adaptación aporta un 72.8% de energía procedente de hidratos de carbono complejos, un 18% de las proteínas y un 9,2% de las grasas. La dieta esteatótica fue formulada y preparada por miembros del grupo de investigación citado en las instalaciones del SAEA. Esta presenta una composición nutricional muy concreta, en la cual un 50% de la energía procede de grasa hidrogenada de palma, cuyos ácidos grasos son saturados en un 50% aproximadamente y una mínima proporción de aceite de girasol para suministrar los ácidos esenciales: linoleico y linolénico, un 43% procedente de hidratos de carbono complejos y un 7% procedente de las proteínas. La dieta además estaba enriquecida en un 2% de colesterol y en un 0,5% de ácido cólico. También estaba deplecionada en colina y en metionina, compuestos importantes que al ser retirados de la alimentación aumentan la disfunción hepática. Los nutrientes y sus respectivos porcentajes de energía quedan reflejados en la tabla 1 que aparece a continuación.

	Control Diet	Steatosis Diet
Average energy intake (kcal/pig/day)	2622 ± 219	3832 ± 576
Carbohydrates (%)^a	72.8	43.0
Starch (%)^a	45.0	17.2
Sucrose (%)^a	8.1	1.5
Fructose (%)^a	8.5	13.5
Glucose (%)^a	6.7	10.8
Protein (%)^a	18.0	7.0
Fat (%)^a	9.2	50.0
Fat Source	Palm oil	Hydrogenated palm and sunflower oil
Caprilic (C8:0)^b	0.1	0.1
Capric (C10:0)^b	0.2	0.04
Lauric (C12:0)^b	3.9	0.5
Miristic (C14:0)^b	1.8	1.0
Palmitic (C16:0)^b	27	39.0
Palmitoleic (C16:1)^b	0.1	0.2
Estearic (C18:0)^b	2.9	8.7
Oleic (C18:1)^b	28.0	32.7 ^c
Linoleic (C18:2 n6)^b	32.5	12.6 ^c
Linolenic (C18:3 n3)^b	2.3	0.1
Araquic (C20:0)^b	0.4	0.4
Gadoleic (C20:1)^b	0.4	0.14
Cholesterol (ppm)	Nil to negligible	20 000
Sodium Cholate (ppm)	Nil to negligible	500
Methionine (ppm)	2160	100
Choline (ppm)	90	16

^aValues represent percent of total daily calories.

^b Fatty acid profile percentage

^c Trans isomers observed. Oleic: 4%, linoleic: 0.2%

Tabla 1. En la parte inicial de la tabla puede observar la composición nutricional de la dieta control con respecto a la dieta esteatósica y en la segunda parte el perfil lipídico de ambas.

3.3. Extracción y purificación de RNA

Este procedimiento consiste en el aislamiento de las moléculas de RNA intactas mediante, en este caso, el uso de un kit comercial (Zymo Research) con columnas de cromatografía siguiendo las instrucciones del fabricante, para las posteriores técnicas de biología molecular utilizadas en el análisis de expresión génica (Macías Ceja, 2017a). Este procedimiento de extracción por columnas presenta las ventajas de ofrecer una purificación de la molécula simultánea a su extracción, que es más rápida y que no utiliza solventes orgánicos con respecto al método tradicional. Como principal desventaja encontraríamos la económica.

Reactivos:

1. TRIzol (solución de lisis con capacidad detergente, caotrópica y reductora)
2. Etanol absoluto
3. RNA Wash Buffer
4. DNase Reacción Mix (DNase I2 + DNA Digestión Buffer)
5. RNA Prep Buffer
6. DNase/RNase free Water

Material:

El RNA es una molécula muy lábil. En su rápida degradación cobran protagonismo las RNasas presentes en tejidos y células y como contaminantes en el laboratorio. Para evitar esta contaminación, se debe trabajar con guantes, usar puntas de pipetas y tubos libres de RNasas y autoclavados del día, micropipetas específicas de extracción de RNA, y todo el resto material y superficies empleados en la extracción deben ser descontaminados con RNasa ZAP.

Procedimiento:

Una vez tomadas las muestras de los hígados, mediante procedimientos percutáneos en el caso de la primera biopsia y quirúrgicos en el caso de la segunda, fueron congeladas de inmediato en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis. El procedimiento comienza añadiendo 1 ml del buffer de lisis (TRIzol) a cada uno de los tubos de polipropileno libres de RNasas que se van a utilizar por muestra. El tejido hepático debe mantenerse en todo momento sobre nieve carbónica. Con un golpe seco sobre este, se realiza la crio fractura del tejido, sin perder la cadena del frío, y con unas pinzas estériles se toma un fragmento que se sumerge de inmediato en el reactivo de lisis. Inmediatamente, las muestras fueron disgregadas físicamente utilizando un agitador de bolas de zirconio hasta la completa disolución del tejido. Posteriormente se prosiguió con el resto del procedimiento hasta la obtención final del RNA que tuvo lugar siguiendo las instrucciones del protocolo. Dentro de este hay una parte inicial enfocada a eliminar el DNA, en el cual se utiliza la columna amarilla (Spin-Away Filter yellow). En una segunda parte enfocada a la purificación, se utiliza la columna verde (Zymo-Spin IIICG Colum green), haciendo un tratamiento con DNasa, y una serie de lavados y centrifugaciones sucesivas hasta el aislamiento final de la molécula purificada. Por último, el RNA se va a eluir con agua libre de RNasas tratada con DPEC y a mantener en congelación a -80°C hasta su próxima utilización.

3.4. Cuantificación del RNA y determinación de su calidad

Tras el aislamiento del RNA explicado anteriormente, este debe ser sometido a 2 técnicas en las que se evalúe su integridad, así como ausencia de posibles contaminantes, y determinar su concentración.

Reactivos:

1. Agarosa en polvo
2. Buffer TBE 1X (TRIS, EDTA y ácido bórico)
3. Tampón de carga
4. Bromuro de etidio
4. Agua MiliQ (para los blancos en el espectrofotómetro)

Equipamiento:

- Básico de laboratorio: micropipeta de bajo volumen, puntas, Erlenmeyer,
- Específico: Espectrofotómetro (SpectoSTAR Nano), cubeta de electroforesis y fuente, peines (labrar los pocillos en el gel), microondas, transiluminador de luz UV, placas de cuarzo.

La primera de técnicas consiste en medir la concentración y pureza de RNA de las muestras con un equipo llamado espectrofotómetro. El espectrofotómetro consta de diversas partes que son una lámpara, un monocromador, el espacio en el que se coloca la muestra, un detector y un dispositivo de lectura, todo ello dirigido por un software instalado en un ordenador próximo al equipo. En este caso se ha utilizado el lector de placas, así como unas placas especiales de cuarzo sobre las que se depositan las muestras y el blanco por duplicado. Por último, se llevó a cabo la lectura de sus absorbancias tras ser excitadas con luz a una longitud de onda de 260 nm. La pureza se verificó por la ratio de absorbancias 260/230 y 260/280. En relación al primero de los ratios, se dieron por buenas las muestras con valores iguales o superiores a 1,8, puesto que aquellas muestras con unos valores inferiores nos alertarían de una posible contaminación por compuestos fenólicos (por ejemplo, TRIzol), reactivos utilizados en la extracción del RNA. En cuanto al segundo ratio se dieron por válidas aquellas muestras con valores superiores a 2, aquellas con valores superiores nos alertarían de una posible contaminación por proteínas con presencia de aminoácidos aromáticos (Ortiz Masiá, 2017).

Posteriormente, para valorar la calidad del RNA se llevó a cabo una electroforesis, corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%, cargándose 500ng de RNA en cada uno de los pocillos del gel. El gel se sometió a una electroforesis submarina en tampón TBE 1X a 80V durante unos 30 minutos. El fundamento en el que se basa esta técnica, consiste en la separación de las moléculas de ácidos nucleicos (en este caso RNA) al ser expuestas a un campo eléctrico sobre una matriz (gel) con un entramado de agarosa a un porcentaje determinado en función del tamaño de la molécula a estudiar.

El objetivo es visualizar las bandas 18S y 28S del RNA ribosómico gracias al bromuro de etidio (colorante) y a la excitación del mismo con un transiluminador de luz UV(GelDoc). La intensidad que presenta la banda 28S debería ser aproximadamente el doble de la 18S.No debería a parecer ningún otro tipo de banda ni difuminación las anteriores en ninguna calle del gel, en el caso de que esto suceda nos podría estar alertando de la presencia de posibles contaminantes y degradación del RNA.

3.5. Análisis mediante RNAseq

Las nuevas tecnologías omicas nos permiten poder estudiar todos los parámetros omicos con precisión y de una forma integradora. La técnica de la secuenciación del transcriptoma nos permite estudiar más de 30000 genes, pudiendo seleccionar aquellos de mayor interés para la NAFLD.

En fases previas del estudio se realizó un pool general con animales tanto del grupo control como del grupo esteatosis. Se procedió a la lectura mediante secuenciación de nueva generación (NSG), concretamente mediante la técnica de secuenciación del transcriptoma (RNA seq) de más del 85% del genoma de ambas condiciones experimentales, en la cual se detectaron modificaciones en la expresión de 14 genes.

En este caso, se procedió a realizar 3 pools de RNA para cada condición experimental, control y esteatosis, agrupando muestras de 4 animales para cada pool parcial de las 2 condiciones experimentales, que corresponden a animales alimentados con dieta normal para los controles, y dieta esteatósica para el grupo esteatosis. Las muestras fueron enviadas al Beijing Genomics Institute (BGI Genomics, Shenzhen, China) en el cual se procedió a la secuenciación del RNA, así como al posterior análisis bioinformático de los datos obtenidos. Finalmente, los resultados de la secuenciación del RNA serán depositados en la base de datos GEO.

3.6. Retrotranscripción

Toda reacción de RTqPCR requiere de la presencia de un ácido nucleico como molde inicial. Este molde puede ser DNA, utilizado en estudios genómicos en células o tejidos, así como para la detección de virus de DNA, o bien de RNA utilizado para la detección de virus de RNA o bien como es nuestro caso para estudios de expresión génica. Sin embargo, el RNA no puede ser amplificado de forma directa, por lo que se requiere de un paso previo denominado retrotranscripción o transcripción reversa (Blas García, 2018). Este procedimiento consistente en la transformación del RNA previamente aislado, valorado y cuantificado a DNA complementario (cDNA).

Reactivos:

1. 5x Primer Script Buffer
2. Primer Script RT Enzyme Mix 1 (Transcriptasa reversa)
3. Oligo DT Primers
4. Random primers (primers aleatorios)
5. RNase free H₂O

Equipamiento:

- Básico de laboratorio: tubos eppendorf, micropipetas de varios volúmenes, puntas, guantes...
- Específico: Termociclador convencional

El proceso se llevó a cabo siendo las instrucciones del kit de Takara, que fue el elegido para el procedimiento, retrotranscribiéndose 500 ng de RNA por muestra. Una vez añadidos los reactivos a cada una de las muestras en el orden que aparece en el listado, fueron procesadas en el termociclador con los ciclos de temperaturas y tiempo indicados por el fabricante (15 minutos a 37°C en los que tiene lugar la acción de la enzima transcriptasa reversa, 5 segundos a 85°C en los que se va a inactivar la enzima por la acción térmica y finalmente 4°C de temperatura de mantenimiento de las muestras). La síntesis de cDNA se llevó a cabo en varios pasos entre los que destaca el *annealing* o hibridación de *primers* a la cadena de RNA molde, la polimerización del cDNA por la acción de la enzima transcriptasa reversa y por último la desactivación de dicha enzima. Una vez obtenido el cDNA, fue almacenado en un congelador a -20°C hasta su utilización en los análisis posteriores.

3.7. Optimización de reacciones para RT-qPCR

Este proceso de optimización, persigue el estandarizar todas las condiciones necesarias para las futuras reacciones de RTqPCR de los diversos genes de estudio, de forma que se doblen el número de copias de DNA en cada ciclo. Para ello se utilizaron diluciones de las muestras de DNA de hígado de cerdo. Las diluciones utilizadas fueron 1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000, que corresponde a 50,5, 0,5 y 0,05 ng por reacción. Tras esto comenzaron a realizarse las distintas reacciones de prueba utilizando los primers previamente diseñados y validados por la herramienta bioinformática BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information). El procesamiento de las muestras se llevó a cabo de forma similar al que explico posteriormente en el siguiente apartado del trabajo. Al tratarse de un volumen de muestra reducido, estas fueron procesadas en el termociclador de RT-qPCR de Applied Biosystems para placas de 48 pocillos situado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria. Finalmente, y mediante el empleo de programa Excel se realizaron las gráficas y se calcularon las eficiencias, quedándonos exclusivamente con aquellos genes que presentaron una eficiencia entre el 90-110% (11 genes del total de los genes de inicio), tras optimizar la concentración de los primers y condiciones de las RTqPCRs de todos los genes estudiados de acuerdo a las MIQUE Guidelines (S. A. Bustin et al., 2009). Concretamente, el gen *SLC25A25* precisó de la reducción ambos primers a la cuarta parte aproximadamente para poder ajustarse a los porcentajes de eficiencia estipulados.

3.8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

3.8.1. ¿Qué es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)?

Esta técnica ideada en 1983 por bioquímico norteamericano Kary Mullis consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento concreto de DNA haciendo uso de una DNA polimerasa termoestable. De esta forma es posible duplicar el número de las copias de este fragmento de DNA en cada uno de los ciclos de amplificación. Cada uno de los ciclos consta de 3 etapas a temperaturas distintas, una etapa inicial llamada desnaturalización en la cual tiene lugar la separación de la doble hélice del DNA por la ruptura de los puentes de hidrógeno, una segunda etapa conocida como *annealing* en la que tiene lugar la hibridación de los cebadores a cada uno de los extremos del fragmento que se desea amplificar y una etapa final conocida como elongación de los cebadores en la cual la DNA polimerasa se encarga de elongar las cadenas.

3.8.2. ¿Qué es la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (RT-qPCR)?

La RT-qPCR procede de la PCR simple, sin embargo, la principal diferencia consiste en la adición a la master mix de un fluoróforo llamado SYBR Green que actúa uniéndose a cada una de las nuevas copias de cDNA que se van sintetizando y que por tanto aumenta proporcionalmente en cada ciclo. El equipo en el que tiene lugar la reacción cuenta con un haz de luz con una longitud de onda de 497 nm capaz de excitar a este agente fluorescente. De esta forma puede realizar mediciones constantes, traducándose esto en el proceso monitorizado de detección de amplicones ciclo a ciclo. Es decir, esta técnica permite al investigador visualizar en tiempo real la progresión de la reacción y cuantificarla. Además, permite poder determinar cantidades mínimas de DNA en las muestras.

3.8.3 Aplicaciones de la RT-qPCR

Las principales aplicaciones de la RT-qPCR son muy variadas y abarcan muchos campos de la ciencia como por ejemplo en campos como la medicina forense en la identificación de individuos, en el campo de la calidad y seguridad alimentaria como parte del control sanitario de los alimentos, en el diagnóstico de enfermedades como titulaciones víricas en infecciones virales o enfermedades genéticas, cuantificación del número de copias de DNA genómico o DNA mitocondrial y por último en los estudios de expresión génica muy útil en diversos tipos de investigación como por ejemplo en la Genómica Nutricional.

Reactivos

1. Muestras de DNA (cDNA) que contienen la secuencia diana
2. Primers o cebadores (directo y reverso) previamente diseñados
3. DNA polimerasa termoestable*
4. desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)*
5. Buffer de reacción (contiene Mg puesto que la enzima es Mg-dependiente) *
6. SYBR Green (fluoróforo de detección que se intercala entre las moléculas de DNA que se van sintetizando) *

* Suelen comercializarse de forma conjunta en un mix, como es nuestro caso (Super Mix)

Equipamiento

- Básico de laboratorio: guantes, pipetas específicas de PCR de varios volúmenes, puntas de pipetas autoclavadas, tubos eppendorff
- Específico: placas multipocillo (en este caso de 384 pocillos), láminas de plástico óptico y el equipo de RT-qPCR Viia 7 de Applied Biosystems. Este equipo está situado en el servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA-IACS).

Procedimiento

Tras la estandarización de las condiciones de cada gen, se llevaron a cabo las reacciones en placas de 384 pocillos, depositando 2,5µl de cDNA y 7,5 µl de master mix por pocillo. La master mix se preparó en el momento, adicionando 5µl de Super Mix, 2,1µl de agua de PCR, y 0,2µl de cada uno de los primers (directo y reverso) por pocillo. En el caso del gen *SLC25A25* fue necesario reducir a la cuarta parte la cantidad de primers añadiendo 0,08µl de cada uno directo y reverso y ajustar el agua a 2,34µl. Una vez incorporadas las muestras a analizar (cDNA) como la master mix en los pocillos de la placa, esta se sella con el plástico óptico y se introduce en el equipo Viia 7 de Applied Biosystems. Es importante poner todas las muestras por duplicado y dejar una de las columnas de la placa para las aguas, que al no contener cDNA actuaran como un control negativo. El procedimiento dentro del equipo tiene varias fases que incluyen la activación de la encima a 95° durante 5-15 minutos, la desnaturalización del cDNA a 95°C durante 15 segundos, el *annealing* o hibridación de *primers* y la extensión de las cadenas de síntesis a 60°C durante 1 minuto en cada uno de los 40 ciclos, y por último las curvas de Melting 60-90°C. Los pasos intermedios: desnaturalización, *annealing* y extensión se repiten secuencialmente en los 40 ciclos que el protocolo tiene establecidos (S. A. Bustin, 2002).

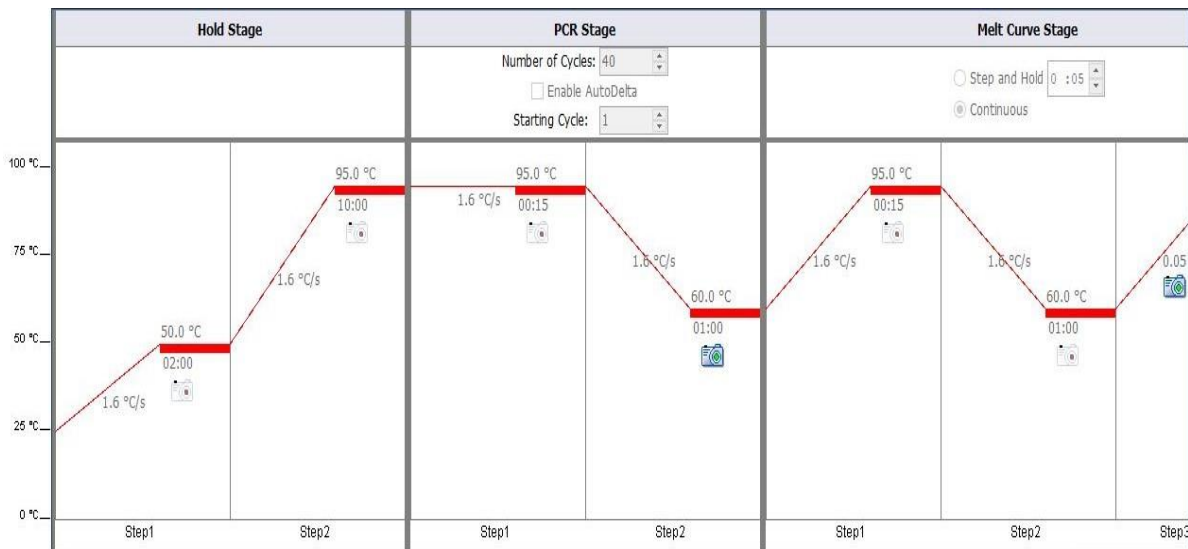


Figura 4. Muestra las etapas de la RTqPCR: desnaturalización, ciclos de PCR y finalmente las Curvas de Mealing.

3.9. Análisis de la expresión génica (Método $2^{\Delta\Delta C_t}$)

Esta metodología nos va a permitir determinar los productos de RTqPCR en dependencia del número de ciclos que se hayan llevado a cabo. Previamente se deben entender las 3 fases de la cinética de amplificación de una PCR. La fase inicial llamada zona de ruido que se corresponde con los primeros ciclos de amplificación. Esta fase no nos va a dar ninguna información relevante, ya que el número de amplicones sintetizados está por debajo del umbral de detección del equipo. Una fase de crecimiento exponencial y fase lineal, en la que tiene lugar la mayor producción de amplicados y gráficamente aparece como una zona de la curva lineal y de mucha pendiente. Y por último la zona de meseta o de plato donde aparece una reducción drástica de las copias producidas en la reacción puesto que los *primers* se han terminado. Dentro estas fases la más importante, desde el punto de vista de cuantificar el grado de expresión génica, es la exponencial puesto que a este nivel el equipo nos va a realizar la recta de corte o umbral, así como a proporcionar el valor de C_t . El C_t se corresponde con el número de ciclos de amplificación de un gen lo que se traduce como el grado de expresión génica que existe de ese gen concreto (Macías Ceja, 2017b).

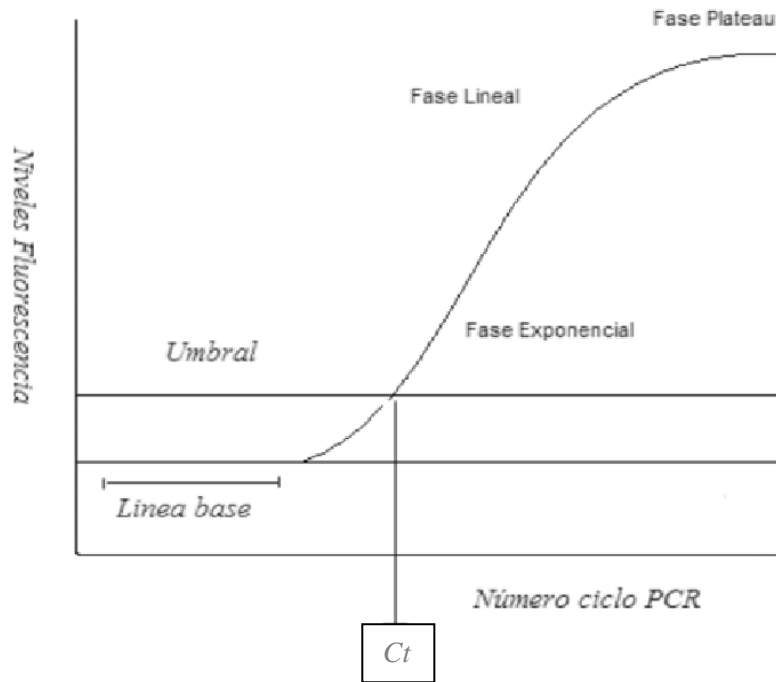


Figura 5. Curva de cinética de la RT-qPCR con sus distintas fases. Adaptado de Gladys Pinilla B (Cubillos, Pinilla MSC, & Rodríguez, 2008)

Para llevar a cabo el procedimiento es necesario definir los genes a estudiar, y utilizar un gen normalizador denominado de referencia. Estos son genes estructuras (ej: Ciclofilina B) o que forman parte de rutas metabólicas vitales para la célula (ej: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*)) que se expresan siempre de forma activa y que por tanto no van a mostrar ningún cambio tras la intervención dietética dato que se verifica haciendo un test estadístico del gen de referencia, que no puede presentar diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales estudiadas. En este caso el gen de control utilizado fue la Ubiquitina (*UBA52*) que fue el mismo que se utilizó para el análisis de otros genes en fases previas del estudio. De esta forma, el análisis comenzó con la obtención de los Ct 1 y Ct 2. Seguidamente se procedió a restar Ct1 menos Ct2 para obtener el valor ΔCt . Se suma o resta un valor fijo a todos los valores obtenidos que haga 0 el promedio del grupo control, obteniéndose así el $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, se calcula la potencia $2^{\Delta\Delta Ct}$, proporcionándonos la diferencia de ciclos entre las condiciones experimentales de control y esteatosis, ya normalizadas para todas las muestras.

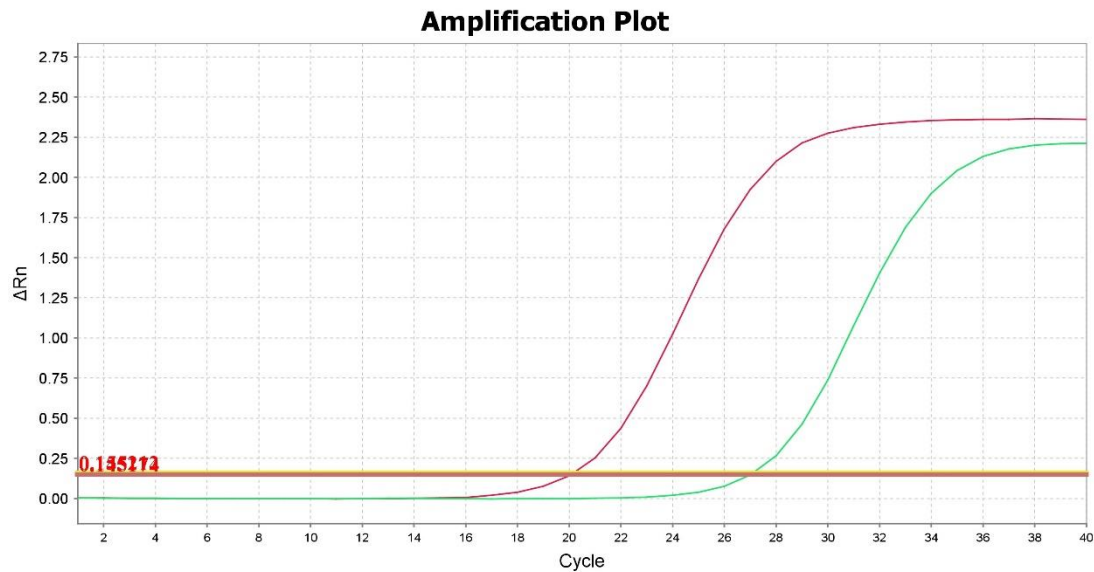


Figura 6. Muestra la diferencia de ciclos entre la expresión del gen *ENTPPL* (en verde) con respecto a la expresión del gen de referencia *UBA52* (en violeta).

3.10. Análisis histopatológico del % de LD

Esta técnica permite al patólogo cuantificar el porcentaje de LD en las secciones histológicas, permitiendo por tanto conocer qué porcentaje de hígado está ocupado por grasa. Para llevar a cabo esta técnica histológica es importante un correcto tallado, fijación en formaldehído al 10 %, procesamiento e inclusión en parafina previa de los tejidos. Posteriormente se llevan a cabo los cortes a 4 μm para la obtención de las secciones histológicas mediante un microtomo de tipo Minot quedando ya listas una vez secas para su tinción.

La técnica de tinción habitualmente empleada es la hematoxilina-eosina. Esta permite teñir las 2 estructuras fundamentales de las células, los núcleos y los citoplasmas. El procedimiento se basa en aprovechar las características químicas de estos colorantes, de forma que la Hematoxilina al tratarse de un colorante básico coloreará fundamentalmente estructuras celulares ácidas como los núcleos, que contienen el DNA, y la eosina que es ácida coloreará estructuras celulares básicas como los citoplasmas.

Reactivos de la tinción:

- 1.Hematoxilina de Carazzi (colorante nuclear)
- 2.Agua corriente del grifo

3.Eosina alcohólica (colorante citolasmático)

4. Batería de soluciones de alcohol etílico con concentraciones diferentes (60%,80%,95% y 100%)

5.Xileno

6. DPX (medio de montaje)

Equipos:

- Básico de laboratorio: guantes de nitrilo (más resistentes al formaldehído)
- Específico: Campana de tallado, procesador automático, estación de inclusión, microtomo tipo Minot, cuchillas (microtomo), baño histológico, estufa, portaobjetos y cubreobjetos.

Procedimiento:

El procedimiento comienza con el desparafinamiento y rehidratación de los tejidos mediante el empleo del xileno y los alcoholes de concentración decreciente. Seguidamente las preparaciones se sumergirán 15 minutos en la hematoxilina de Carazzi. A continuación, las preparaciones se lavarán con agua corriente para eliminar los restos de colorante, así como para el azuleamiento de los núcleos. Únicamente restó sumergir las preparaciones 15 segundos en la eosina y de seguido se procedió a la deshidratación de los cortes a través de la batería de alcoholes de concentración creciente hasta finalizar en la cubeta del xileno. La tinción finalizó con el montaje de las preparaciones histopatológicas mediante la colocación del cubreobjetos con el medio DPX.

Tras el dejar secar las preparaciones unas 24 horas se observaron bajo el microscopio Nikon, realizándose las fotografías correspondientes. Posteriormente se procedió a la cuantificación de las LD mediante el uso de del programa Adobe Photoshop. De esta forma se puede calcular el porcentaje de hígado ocupado por grasa. En procedimiento es fundamental la pericia del patólogo o investigador que lo realice puesto que en ocasiones las LD son muy pequeñas y puede resultar difícil distinguirlas de las luces de vasos sanguíneos intrahepáticos.

3.11. Inmunohistoquímica de la proteína CD68

¿Qué es la inmunohistoquímica (IHQ)?

La IHQ es una técnica habitual en los laboratorios de Anatomía Patológica (AP) utilizada para la detección de compuestos específicos, denominados antígenos (Ag) en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (Ac). El fundamento de esta técnica se basa en la elevada sensibilidad y especificidad de presentan los Ac para unirse a determinadas moléculas y no a otras.

Sin embargo, esta unión Ag-Ac no es posible visualizarla al microscopio, por lo que es necesario conjugar los Ac con otras sustancias que permitan su visibilidad. Estas sustancias pueden ser o bien un fluoróforo, empleados habitualmente en la técnica de inmunofluorescencia, o bien una enzima, que generalmente se trata de la peroxidasa. Estas últimas tienen la capacidad de transformar sustancias incoloras en sustancias coloreadas, apareciendo por tanto una coloración parda exclusivamente en las zonas histológicas donde tiene lugar la unión.

En este caso, se estudió mediante IHQ en muestras de hígado, la proteína inflamatoria CD68. Esta proteína se utiliza como biomarcador para detectar y cuantificar la presencia de infiltrado de macrófagos en los hígados y por tanto la presencia de inflamación. Entre sus múltiples funciones la expresión de CD68 parece estar relacionada con la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) en las paredes de los vasos sanguíneos y con el estadio inicial de la arteriosclerosis.

Esta técnica se realizó a partir de muestras de tejido hepático que fueron fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina. Tras esto fueron cortadas con un espesor de 4µm con un microtomo de tipo Minot al igual que se ha explicado en el apartado anterior. El kit elegido para llevar a cabo la determinación fue el de Vector.

Reactivos:

1. Citrato buffer
2. TBS 1X
3. Anticuerpo primario anti-CD68 (Bio-Rad)
4. Boxall Blocking Solution (bloqueante de la peroxidasa endógena)
5. Suero de caballo al 2,5% (aumenta la sensibilidad y especificidad de la unión del Ac)
6. ImmPRESS Universal Polymer Reagent
7. Cromógeno: ImmPACT Reagent 1 e ImmPACT Reagent 2 (Diaminobenzidina + diluyente)

Equipamiento:

- Básico de laboratorio: nevera, pipetas Pasteur, gradilla, tubos eppendorff, micropipetas, guantes, frasco lavador con agua destilada...
- Específico: olla a presión

Procedimiento

Tras obtener las secciones histológicas se procedió a la desparafinación y rehidratación de estas mediante xileno y alcoholes de concentración decreciente. Seguidamente, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico mediante la incubación de los cortes con citrato buffer en olla a presión. Se prosiguió con todos los pasos del procedimiento de Vector hasta la finalización de la técnica. Dentro del protocolo, el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena, la adición del anticuerpo primario anti-CD68, con su incubación correspondiente durante toda la noche en refrigeración y protegido de la luz, y la adición del complejo secundario marcado al día siguiente, son los pasos más importantes. Finalmente se procedió a evaluar las preparaciones bajo el microscopio óptico y a la cuantificación del grado de expresión de la proteína citada.

Previamente a la realización de esta actividad, junto a la Dra. Carmen Arnal (Patóloga) y al doctorando Seyed Hesamoddin Bidooki, llevamos a cabo el trabajo de estandarización del anticuerpo anti-CD68, quedándonos finalmente con una dilución de 1/2000, que pareció ser la más adecuada para la obtención de unos resultados óptimos.

3.11. Análisis de parámetros bioquímicos séricos

Se analizaron 25 parámetros bioquímicos séricos como glucosa, cuerpos cetónicos, perfil lipídico, perfil hepático, citoquinas y adipoquinas...en las muestras de plasma sanguíneo de los cerdos al inicio y al finalizar la intervención dietética mediante un autoanalizador en el Servicio de Bioquímica clínica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

3.12. Tratamiento de datos

La gestión y tratamiento de los datos ha sido llevada a cabo fundamentalmente mediante el programa Excel, SPSS y GradPad. Con Excel se han realizado las curvas de eficiencia para optimización de las reacciones de RTqPCR. Se ha utilizado para el análisis y la cuantificación de la expresión génica el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ explicado anteriormente. Para el análisis estadístico propiamente dicho se ha utilizado el programa GradPad, realizándose el test no paramétrico de U de Mann-Whitney de 2 colas para cada gen. Este programa también ha sido el utilizado para elaborar los diagramas de cajas y bigotes o box Plot para cada uno de los genes estudiados en las muestras control y tratamiento permitiendo comparar de forma gráfica y sencilla cual ha sido el efecto de una dieta u otra sobre los animales.

Finalmente, también ha servido para elaborar la matriz de datos de todas las variables a estudiar posteriormente mediante estudios de correlación.

El estudio de correlación entre las diversas variables de estudio ha sido llevado a cabo a partir de datos individuales con el programa SPSS aplicando el test Rho de Spearman, considerando una correlación estadísticamente significativa aquella con un valor $P < 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1. Resultados parámetros bioquímicos

De todos los parámetros bioquímicos estudiados con el autoanalizador y analizados mediante el test estadístico de Man Whitney, se muestran diferencias estadísticamente significativas en 12 de estos. Aquellos que presentaron un valor $p < 0,05$ fueron 4: triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (NEFA), gamma glutamil-transferasa (GGT) e interleuquina 6 (IL-6). Los que presentaron un valor $p < 0,01$ fueron: colesterol, bilirrubina total e interleuquina 8 (IL-8). Por último, aquellos con un valor $p < 0,001$ fueron: colesterol LDL (cLDL), cuerpos cetónicos (KB), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), leptina e interleuquina 12 (IL-12).

Parámetros Bioquímicos Séricos	Control (n=12)	Esteatosis (n=12)
Glucosa (mg/dL)	91 ± 9	93 ± 20
TG (mg/dL)	33 ± 10	24 ± 7 ^a
Colesterol total(mg/dL)	82 ± 10	147 ± 62 ^b
cLDL (mg/dL)	23 ± 3	90 ± 38 ^c
cHDL (mg/dL)	54 ± 7	52 ± 22
Colesterol libre (mg/dL)	17 ± 2	23 ± 10
KB (μM)	149 ± 87	36 ± 35 ^c
NFA (mM)	0,11 ± 0,11	0,05 ± 0,09 ^a
AST (U/L)	48 ± 16	60 ± 22
ALT (U/L)	42 ± 6	24 ± 5 ^c
ALP (U/L)	5 ± 2	132 ± 74 ^c
GGT (U/L)	51 ± 13	60 ± 10 ^a
Bil total (mg/dL)	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3 ^b
Insulina (ng/mL)	3 ± 1	2 ± 1 ^a
Adiponectina (μg/mL)	14 ± 2	13 ± 2
Leptina (pg/mL)	199 ± 138	2229 ± 1531 ^c
TNFα (pg/mL)	25 ± 20	43 ± 70
IL-1β (pg/mL)	16,3 ± 27,8	11 ± 17
IL-4 (pg/mL)	0 ± 0	0,1 ± 0,2
IL-6 (pg/mL)	4 ± 8	16 ± 16 ^a
IL-8 (pg/mL)	3 ± 4	7 ± 6 ^b
IL-10 (pg/mL)	26 ± 24	50 ± 4
IL-12 (pg/mL)	384 ± 227	129 ± 94 ^c
IFN-α (pg/mL)	0,9 ± 2	0,9 ± 2
IFN-γ (pg/mL)	0,0 ± 0,0	13 ± 20

Tabla 2. Muestra los datos analizados mediante el test de Mann Whitney. Los datos se presentan como la media ± SD. Los valores acompañados por una “a” presentan un valor $p < 0,05$, los acompañados por una “b” presentan un valor $p < 0,01$ y los acompañados por una “c” presentan un valor $p < 0,001$.

4.2 Resultados de RNAseq

Como se ha explicado anteriormente, se efectuaron 3 pooles parciales de RNA de 4 animales para cada condición experimental (control y esteatosis) estudiándose los genes hepáticos mediante RNAseq. Seguidamente se analizaron los resultados obteniendo 23 nuevos genes modificados por la intervención dietética, con un grado de expresión variable entre ellos. Además de estos 23 genes, volvió a aparecer incrementada la expresión del gen de la Galectina 3 (*LGAL S3*), al igual que se observó en RNA seq previo.

Se estableció para los genes a estudiar un valor de veces de cambio (Fold of Change) de 4,6 para los genes sobreexpresados, y de -2,6 para los genes inhibidos. Los genes que presentaron un valor de Fold of Change superior a 4,6 fueron: *SPP1*, *MCOLN3*, *SLC51B*, *ATP2B3*, *LOC100520753*, *GPNMB*, *PLP1*, *LOC110257900*, *LPO*, *DCSTAMP*, *ATP6V0D2* y *LGAL3*. Por otro lado, los genes que presentaron un valor de Fold of Change inferior a -2,6 fueron: *MT3*, *NRN1*, *ARG2*, *PEBP4*, *SLC25A25*, *ENTPPL*, *MT1D*, *DCST1*, *SQLE*, *LOC102166944*, *MOXD1* y *NANOS1*. De los anteriores genes citados 6 de ellos (*ATP6V0D2*, *DCSTAMP*, *ATP2B3*, *MCOLN3*, *NRN1* y *DCST1*) fueron descartados para los estudios individuales mediante RT-qPCR, puesto que ofrecieron una mínima señal en el RNAseq.

Para verificar que los resultados obtenidos por ambas técnicas son equivalentes, se muestra en la figura 6 el gráfico de las veces de cambio obtenida en el RNAseq con los pooles parciales y mediante RT-qPCR de las determinaciones individuales, obteniendo un valor de $R^2=0.8193$, que da un valor de R superior a 0,9, por lo que podemos considerar equivalentes los resultados obtenidos por ambas técnicas analíticas.

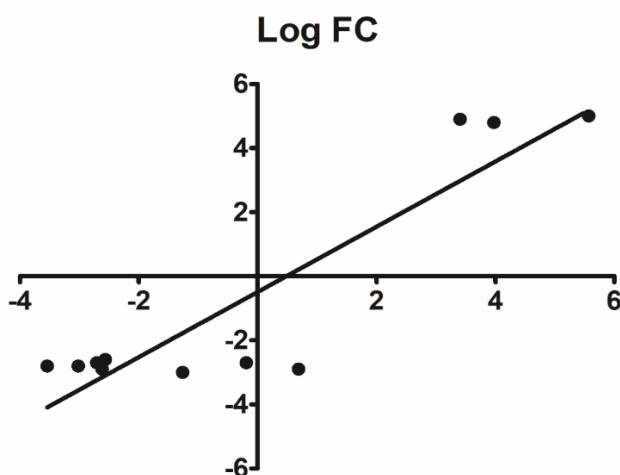


Figura 7. Correlación entre ambos métodos analíticos RNAseq y RT-qPCR

4.3. Resultados de la optimización de reacciones para RT-qPCR

El estudio de los pooles de muestras de animales mediante RNAseq es una técnica exploratoria grupal, sin embargo, esos datos deben ser verificados individualmente en cada uno de los animales. De esta forma se pudieron identificar animales fuera de rango (outliers). Dicha confirmación se realizó mediante RT-qPCR.

Se procedió al diseño de primers mediante el uso de la herramienta bioinformática BLAST, como se ha nombrado anteriormente. Las condiciones y características utilizadas quedan disponibles

para su posible reproducción por parte de otros investigadores, tras el trabajo de optimización, en la siguiente tabla siguiendo los principios indicados por las MIQUE Guidelines.

Name	Seq	Quantity	Quality	GeneID	Amplicon	Exon	Efficiency
LPO_Pig_PrD	GTGAATCAGGCCAAGGTCCA	25 nmole	STD	XM_021067272.1	269	4-6	No señal
LPO_Pig_PrR	ACTGGTGCATCACAGCCTAC	25 nmole	STD				
Loc110257900_Pig_PrD	AACCAGGGCTGTTGATGAGG	25 nmole	STD	XM_021080904.1	271	2	
Loc110257900_Pig_PrR	TGGTCTCGTCCTTGCTGAAC	25 nmole	STD				118% *
PLP1_Pig_PrD	TTGGCGACTACAAGACCACC	25 nmole	STD	NM_213974.1	198	2-3	
PLP1_Pig_PrR	ACACTAGGAGCCACACAACG	25 nmole	STD				131% *
GPNMB_Pig_PrD	CGCCAAACGGTTTCAGGATG	25 nmole	STD	NM_001098584.1	334	1-4	99,83
GPNMB_Pig_PrR	AACATATGGGTCGGGGGATG	25 nmole	STD				
Loc100520753_Pig_PrD	GGTGCGGTTGTCTCAGTTAC	25 nmole	STD	XM_013978575.2	130	1	99,31
Loc100520753_Pig_PrR	CCTCCACCCAGAGTCCATCT	25 nmole	STD				
SLC51B_Pig_PrD	GGCTGTGGTGGTCGTGATAA	25 nmole	STD	XM_005658570.3	121	1	
SLC51B_Pig_PrR	TCCAACCTCAGCCAGGTAGA	25 nmole	STD				90%
MT3_Pig_PrD	CTCGACATGGACCCTGAGAC	25 nmole	STD	NM_214056.1	139	1-3	
MT3_Pig_PrR	ATTTCTCACACTCGGCAGGG	25 nmole	STD				127% *
AGR2_Pig_PrD	GGTGGGTGGGAAACTCAGAT	25 nmole	STD	NM_001244968.1	400	1-6	
AGR2_Pig_PrR	ACGTACTGGCCATCAGGAGA	25 nmole	STD				71%
PEBP4_Pig_PrD	TGGAGACATTGGCTGGTGAC	25 nmole	STD	NM_001162888.1	346	3-6	96,96
PEBP4_Pig_PrR	GCAGTTATCTCCGCTTGGGT	25 nmole	STD				
SLC25A25_Pig_PrD	ATCGTACAAGCTGGCGACAA	10 nmole	STD	NM_001164510.1	145	2-3	102,47
SLC25A25_Pig_PrR	TCTCTTGGGCATCAATGCGT	10 nmole	STD				
ETNPPL_Pig_PrD	GTTTGCCGCTCTGGATGTA	25 nmole	STD	XM_021101686.1	140	1	94,28
ETNPPL_Pig_PrR	AAAAAAGGCCAACACCCCTGA	25 nmole	STD				
MT1D_Pig_PrD	TAAGTGTAGCTGCTGTGCCT	25 nmole	STD	XM_021093892.1	104	2	100,44
MT1D_Pig_PrR	TAGCAATCGAGTCAGGGTCA	25 nmole	STD				
SQLE_Pig_PrD	GGTCCAGTTGCGCTGATTTT	25 nmole	STD	NM_001101026.1	153	10-11	101,25
SQLE_Pig_PrR	CAGTACAGCGCCACTACTGA	25 nmole	STD				
LOC102166944_Pig_PrD	GTATAAACCTGAGCACGCGG	25 nmole	STD	XM_021093890.1	267	1-3	115% *
LOC102166944_Pig_PrR	ACTTGTCGAGGCTCCTTTG	25 nmole	STD				
MOXD1_Pig_PrD	CCAAGTACCACGCCTCCAAT	25 nmole	STD	XM_001926931.3	287	3-5	99,56
MOXD1_Pig_PrR	GTCCAGAACACTGTCGCTGA	25 nmole	STD				
NANOS1_Pig_PrD	TGCAGGTGTGTGTGTTTTC	25 nmole	STD	XM_001928298.4	167	1	
NANOS1_Pig_PrR	CGGGCAGTACTTGATGGTGT	25 nmole	STD				110%

Tabla 3: Características de los primers utilizados en las RT-qPCRs de acuerdo a las MIQUE Guidelines. Aparecen con asterisco aquellos genes con eficiencias superiores al 110% y que no se utilizaron en las reacciones posteriores.

4.4. Resultados RT-qPCRs

En este TFG se ha confirmado la expresión de 11 de estos genes, aquellos que tras su optimización presentaron unas eficiencias entre 90-110%, mediante la utilización de la RT-qPCR, obteniendo los siguientes resultados reflejados en la tabla 4. Sin embargo, se eliminaron genes

con poca señal por RT-qPCR, como es el caso del gen *LPO* de la tabla 3. No hubo grandes diferencias entre los resultados de expresión génica obtenidos mediante ambas técnicas.

Genes	Control	Esteatosis
<i>MTID</i>	3,7 ± 3,5	0,3 ± 0,3*
<i>GNMB</i>	1,2 ± 0,7	55,4 ± 38,5***
<i>SQL</i>	1,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0***
<i>ENTPL</i>	1,4 ± 1,0	0,2 ± 0,2**
<i>LOC100520753</i>	3,3 ± 3,9	35,1 ± 21,7**
<i>LOC102166944</i>	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,3
<i>MOXD1</i>	1,2 ± 0,7	0,2 ± 0,1***
<i>NANOS1</i>	1,6 ± 1,6	0,3 ± 0,1**
<i>PEPB4</i>	1,2 ± 0,7	0,5 ± 0,4*
<i>SLC51B</i>	1,7 ± 1,8	17,7 ± 10,0**
<i>SLC25A25</i>	1,2 ± 1,1	3,2 ± 0,2*

Tabla 4: Datos (media ± desviación estándar) de la expresión de cada gen en unidades arbitrarias normalizadas con los datos de *UAB52*.

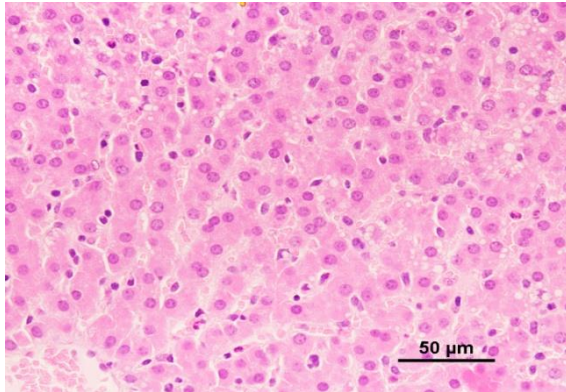
Se aprecia como de los 11 genes estudiados, aquellos en los que más cambia su expresión obteniéndose unos resultados estadísticamente significativos tras la aplicación del test de Mann Whitney, habiéndose normalizado con el gen de referencia (*UAB52*), son 10. Dentro de estos 10 genes, aquellos con un valor $P < 0,005$ (los de mayor significancia estadística) son los genes *GNMB*, *SQL* y *MOXD1*, marcados con 3 asteriscos. Los que presentan un valor $p < 0,01$ son los genes *ENTPL*, *LOC100520753*, *NANOS1* y *SLC51B*, marcados con 2 asteriscos. Y finalmente con un valor $p < 0,05$ los genes *MTID*, *PEPB4* y *SLC25A25* marcados con un solo asterisco. El gen *LOC102166944* no ha mostrado significación estadística. En la mayoría de estos genes podemos observar como en la situación de inicio o control están más sobre expresados mientras que en el tratamiento o esteatosis podemos observar cómo su expresión se inhibe. Esto es así en todos los genes excepto en *GNMB*, en *LOC10052* y en *SLC25A25* donde sucede lo inverso.

4.5 Resultados porcentaje de gotas lipídicas (LD%)

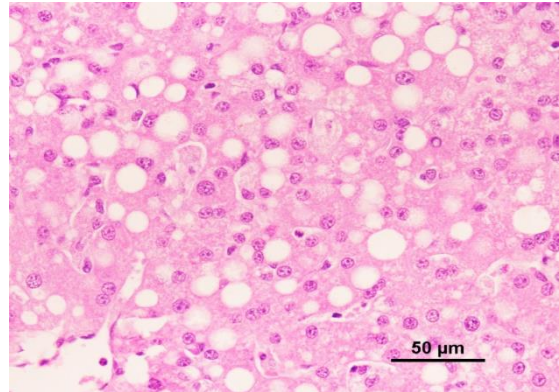
Después de 2 meses de intervención dietética con la dieta esteatósica, podemos confirmar que los cerdos presentaron NAFLD. Esta afirmación queda demostrada con la histología hepática. Cuando se comparan las preparaciones histopatológicas de ambas condiciones, controles o inicio con las de esteatosis o tratamiento, se observa que durante este breve periodo de tiempo se ha

pasado de un 1% a un 32% de media de porcentaje de LD. Siendo estos resultados estadísticamente significativos con un valor p de 0,0002.

A)



B)



C)

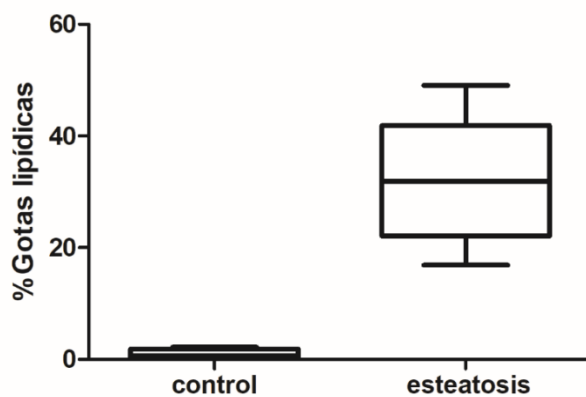


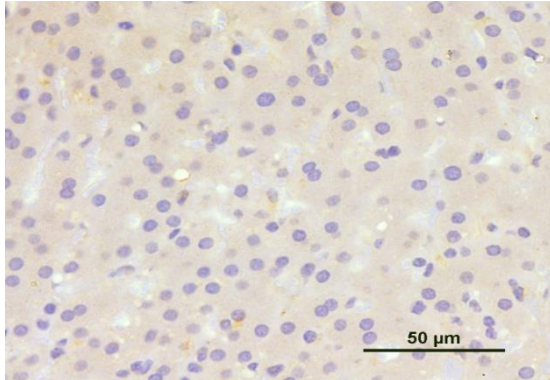
Figura 8. Caracterización hepática del desarrollo de NAFLD en el cerdo como modelo animal. Micrografías de secciones hepáticas representativas, teñidas con hematoxilina-eosina, a x400 aumentos. Micrografía representativa de las muestras control (A). Micrografía mostrando los cambios tras el consumo de la dieta esteatósica durante 2 meses (B). Cambios en el contenido de grasa del hígado expresado como el porcentaje del área del total de la sección hepática (C).

4.6. Resultados de la inmunohistoquímica de la proteína CD68

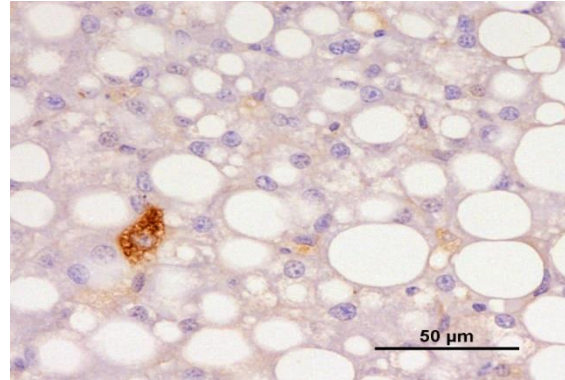
Tras realizar la inmunohistoquímica para la detección y cuantificación de la proteína inflamatoria CD68 en las secciones histológicas tanto de las muestras hepáticas de inicio como en las de tratamiento o esteatosis se llegó a la siguiente conclusión. Se puede afirmar que los niveles de

proteína CD68 aumentaron cuando los cerdos recibieron la dieta esteatósica, con respecto a la dieta control, situación en la que los niveles de la proteína se encuentran bajos obteniéndose un valor $p < 0,001$.

A)



B)



C)

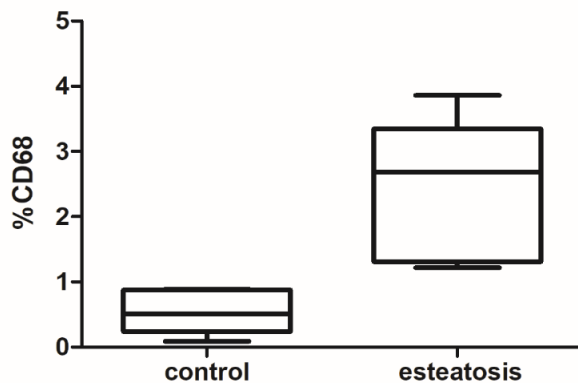


Figura 9: Detección y cuantificación de la proteína CD68, que aparece en color marrón, en el cerdo como modelo animal. Micrografías a x600 mostrando la escasa cantidad de proteína en las muestras control (A) con respecto al aumento de la misma en las muestras con esteatosis (B). Cambios en el contenido de proteína CD68 expresados en tanto por ciento entre ambas condiciones experimentales (C).

4.7. Resultados estudio de correlación

Una vez llevado a cabo el estudio de correlación de datos en el que se han analizado un total de 58 variables entre las se incluyen los genes , los parámetros bioquímicos citados en la tabla 2, el porcentaje de gotas lipídicas realizado por un patólogo y la IHQ de la proteína inflamatoria CD68,

aquellos parámetros que han presentado una correlación más elevada, han sido: porcentaje de gotas lipídicas (LD%), citocromo P51 (CYP51), escualeno epoxidasa (SQLE), etanolamina-fosfato fosfo-liasa (ENTPPL) y los cuerpos cetónicos (KB).

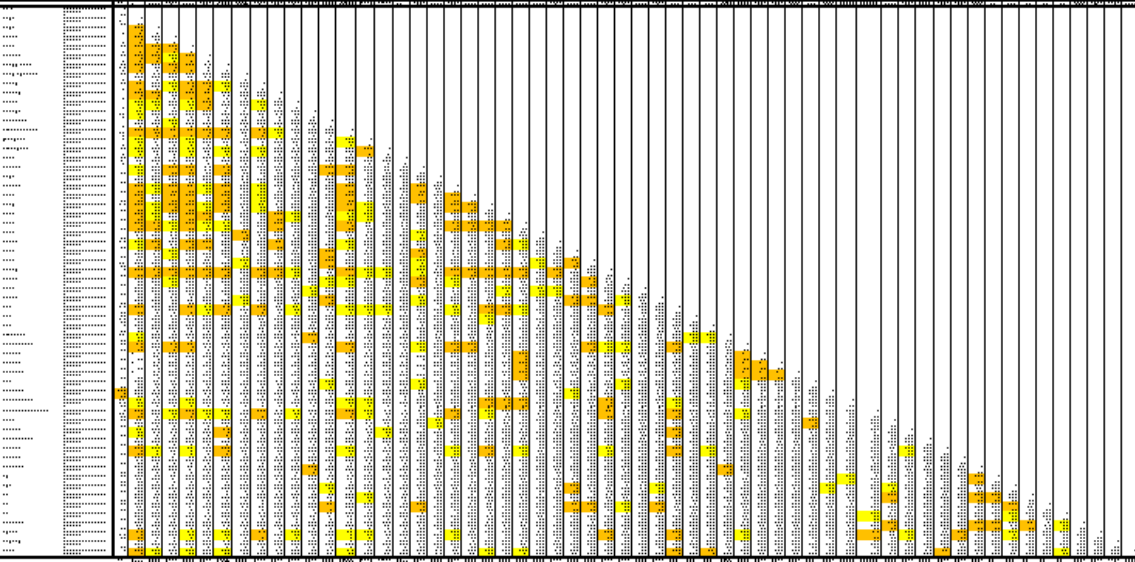


Tabla 5: muestra la tabla de correlación bivariada de los distintos parámetros. Pueden apreciarse en color naranja las correlaciones significativas con un valor $p < 0,01$ y en amarillo las correlaciones significantes con un valor $p < 0,05$.

Tras el exhaustivo análisis de la matriz de correlación de datos, obtenida mediante la herramienta estadística SPSS, se escogieron aquellos parámetros con mayor número de correlaciones como podemos observar en la tabla que viene a continuación.

Parámetros	Valor P <0,01	Valor P <0,05	suma
<i>Grupo</i>	20	9	29
<i>LD_PORCENTAJE</i>	15	10	25
<i>CYP51</i>	19	6	25
<i>SQLE</i>	16	7	23
<i>FDPS</i>	14	7	21
<i>ALP</i>	13	8	21
<i>LOC110257900</i>	12	7	19
<i>LGAGS3</i>	12	7	19
<i>SPPI</i>	12	7	19
<i>GPNMB</i>	11	7	18
<i>SMPDL3</i>	10	7	17
<i>MTID</i>	8	8	16
<i>CUERPOSCETONICOS</i>	8	8	16
<i>IL12P40</i>	6	9	15
<i>ENTPPL</i>	8	6	14

Tabla 6: muestra los parámetros con mayor número de correlaciones.

En relación a las correlaciones más interesantes, el % LD correlaciona de forma significativa con un valor $p < 0,01$ con los siguientes genes: *GPNMB*, *SQLE*, *ENTPPL*, *LOC110257900*, *MOXD1*, *LGAL S3*, *SPPI*, *CYP51*. Y correlaciona de forma significativa con un valor $p < 0,05$ con los siguientes genes: *MTID*, *NANOS1*. *LGAL S3* correlaciona con *MTID*, *SQLE*, *LOC110257900*, %LD, TG hepáticos. Con respecto a los parámetros bioquímicos séricos, los KB correlacionan bien con *GPNMB*, *SQLE*, *ENTPPL*, *LOC110257900*, *MOXD1*, *PEBP4*, *LGAL S3*, % LD y con los TG hepáticos.

5.DISCUSIÓN

El hígado tiene un papel fundamental en el metabolismo energético, DNL y captura de lípidos dietéticos, por este motivo, puede acumular lípidos en exceso, e iniciarse la esteatosis. La NAFLD se está convirtiendo en una de las enfermedades crónicas más prevalentes en el mundo. Los hábitos dietéticos y la inactividad física están en gran medida detrás de esta patología. Como se ha nombrado anteriormente si esta enfermedad no es tratada a tiempo puede progresar hacia otras entidades clínicas más graves como la cirrosis o incluso el cáncer hepático corriendo un grave riesgo la vida de las personas. Por todas estas circunstancias varios grupos de investigación a nivel nacional e internacional están inmersos en el estudio de esta enfermedad hepática todavía muy desconocida.

Para poder llevar a cabo estas investigaciones es preciso contar con modelos animales que reproduzcan de una forma lo más semejante posible la NAFLD a como sucede en el humano. Por lo que se necesita un animal que tanto desde el punto de vista genético como anatómicamente y fisiológicamente sea análogo a este. Por ello se eligió el cerdo como modelo perfecto. Para conseguir la esteatosis de estos animales, puesto que ejercían cierta resistencia, se les

administraban sustancias tóxicas como el alcohol. En 2009 se describió por primera vez un modelo de NAFLD porcino obtenido exclusivamente mediante intervención dietética. Este modelo era el cerdo Ossabaw, un minipig que mediante una dieta modificada desarrollaba síndrome metabólico severo y una histología hepática anormal semejante a la de la NAFLD del humano (Bassols et al., 2014). Posteriormente el mismo grupo describió en el año 2015 estos mismos cerdos como un modelo de NASH con las lesiones características (degeneración, balonización de los hepatocitos, fibrosis...) que suceden en los humanos (Martínez Soriano, 2017). Para este estudio, al igual que para otros llevados previamente por el grupo de investigación, se han utilizado cerdos Large White x Landrace. Estos cerdos a diferencia de los otros modelos tienen la característica de que desarrollan NAFLD o incluso estadios más avanzados de la enfermedad como la NASH exclusivamente mediante la intervención dietética con la dieta preparada ad hoc, desarrollando una esteatosis macrovesicular muy agresiva para la arquitectura y funcionalidad hepática. Esta dieta enriquecida en colesterol, ácido cólico y deplecionada en colina y metionina, fue capaz de generar NAFLD en los cerdos en tan solo un periodo de 2 meses.

En relación a los distintos resultados obtenidos tras todos los análisis, este TFG se va a centrar en discutir únicamente los genes del RNAseq, así como su posible correlación con algún parámetro bioquímico sanguíneo y con el porcentaje de gotas lipídicas de los hígados y con el grado de expresión de la proteína CD68.

Después de 2 meses de intervención dietética estos cerdos presentaron NAFLD lo cual se ha demostrado mediante el análisis de la histología hepática, pasando de una media del 1% de LD a un 32%. Además, no solo presentan NAFLD, sino que se llegó a un estadio más avanzado de la enfermedad, la NASH. Esto es así debido principalmente a la gran agresividad que provoca esta dieta preparada sobre el hígado, que además de generar depósitos grasos, provoca toda una serie de acontecimientos patológicos como balonización de los hepatocitos, incremento del estrés oxidativo, peroxidación lipídica, producción de citoquinas proinflamatorias, apoptosis, activación de células estrelladas y fibrosis. Además estos resultados coinciden con otros estudios anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación (Gonzalo et al., 2012).

Además de la NAFLD y las alteraciones anatomopatológicas descritas, después del tratamiento con la dieta esteatósica la IHQ de CD68 mostro unos niveles elevados de esta proteína inflamatoria en los hígados de estos animales con respecto a las muestras del inicio o control por lo que puede deducirse que hay más macrófagos en los hígados con NAFLD frente a los sanos y por tanto mayor inflamación como se muestra en la figura 7. También se puede deducir que esta llegada de macrófagos al foco inflamatorio es dependiente de cada animal, pero podría estar mediada por el efecto quimiotáctico de todas las sustancias que se producen en la NASH.

Como podemos observar en la tabla inferior, de los 11 nuevos genes cuya expresión se ve modificada por la intervención dietética tras analizar los datos del RNAseq, 2 están relacionados con el metabolismo lipídico (síntesis de colesterol y síntesis de fosfolípidos), 2 son transportadores de iones metálicos, 1 es un transportador de ácidos biliares, 1 es un gen con función inmune y otros sin embargo presentan múltiples funciones fisiológicas como la apoptosis entre otras.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Función biológica	Fold of change RNAseq	Fold of change RTqPCR
Metalotioneína-1E	<i>MT1D</i>	Respuesta celular al Zn y Cu	0,1	0,1
Glicoproteína transmembrana de melanoma B no metastásico	<i>GPNUMB</i>	Regulación negativa de actividad y proliferación de células T, de producción de citoquinas, de proliferación celular	32,2	47,4
Escualeno epoxidasa	<i>SQLE</i>	Biosíntesis y metabolismo de esteroides	0,1	0,1
Etanolamina fosfato fosfoliasa	<i>ENTPPL</i>	Metabolismo de fosfolípidos Biosíntesis de fosfatidiletanolamina	0,1	0,2
Monoxygenase DBH like 1	<i>MOXD1</i>	Unión al ion Cu, unión a proteínas	0,2	0,2
Nanos C2HC-tipo dedo de Zn 1	<i>NANOS1</i>	Unión al mRNA, unión de proteínas, represor de la traducción, mejora la unión del ion Zn, regulación negativa de la traducción.	0,2	0,2
Fosfatidiletanolamina binding protein 4	<i>PEBP4</i>	Unión de proteínas	0,1	0,4
Transportador de solutos subunidad 51beta	<i>SLC51B</i>	Trasporte y secreción de ácidos y sales biliares, regulación positiva de la salida de proteínas del Retículo Endoplásmico (RE) y de la glicosilación de estas, estabilización de las proteínas, transporte transmembrana.	28,6	15,7
Transportador de solutos familia 25, miembro 25	<i>SLC25A25</i>	Transporte transmembrana de ATP, transporte transmembrana de Ca, desarrollo del tejido adiposo, activación tras la ingesta, respuesta ante un exceso de ingesta de alimentos	0,1	1,6
Galectina 3	<i>LGALS3</i>	Implicado en la unión de IgE, unión del RNA, unión de carbohidratos, actividad quimiotáctica, unión de proteínas, apoptosis	53,9	1,1

Tabla 7. Principales funciones de los genes analizados mediante RNAseq y RT-qPCR (National Library of Medicine, n.d.).

En relación a los genes involucrados con el metabolismo lipídico, muy conocido es el papel del gen HMG-CoA reductasa como punto de control en la ruta de biosíntesis del colesterol a nivel hepático, sin embargo, el gen de la *SQLE* y el *CYP51*, sabemos que también forman parte de esta

esta vía en uno puntos mucho más distales de la ruta, teniendo también un efecto regulador fundamental en la síntesis de esta biomolécula.

Concretamente la enzima codificada por el gen *SQLE*, la cual comparte el mismo nombre, Escualeno epoxidasa, está implicada en catalizar el paso de la reacción entre el escualeno y el 2,3 epóxido de escualeno. Este paso resulta de gran importancia en la síntesis de los esteroides por lo que podría ser una diana terapéutica importante para algunas enfermedades relacionadas con estos. Algunos fármacos antimicóticos como los Azoles y la Amorolfina, muy utilizados en el tratamiento tópico de la micosis de uña actúan bloqueando la acción de esta enzima evitando así la síntesis del ergosterol y por tanto la formación de la pared celular del hongo (Tapia, 2005).

En este estudio, podemos deducir que la expresión de este gen es mucho menor tras la intervención con la dieta esteatósica que al inicio de tratamiento debido a esa acción de punto de control o checkpoint que ejerce el gen sobre la ruta de biosíntesis del colesterol. Se debe recordar que las LD además de TG contienen también colesterol, y que, en la NAFLD, la salida de VLDLs del hígado está muy limitada por lo que el colesterol se acumula en el hígado y por tanto el organismo no necesita sintetizar más inhibiendo la acción de esta enzima. Sin embargo, en este estudio como podemos apreciar en la tabla 2 los niveles de colesterol total sérico son casi el doble tras la dieta esteatósica que antes de iniciar el tratamiento pasando de 82mg/dl a 147mg/dl. Para confirmar este acontecimiento sérico, podría ser conveniente realizar un estudio de la apolipoproteína B100 (ApoB100) en las diferentes lipoproteínas del suero, necesaria en la formación de las VLDLs necesarias para la exportación de grasa del hígado, pudiendo valorar si se están formando más o menos VLDLs en cada condición experimental, o si están cargadas de más cantidad de colesterol en los animales esteatósicos.

De igual manera el gen *CYP51*, que codifica para la enzima lanosterol 14 α -demetilasa (enzima de la familia del Citocromo P450) también implicada en la biosíntesis del colesterol y otros esteroides, se encuentra también inhibido tras la intervención dietética, lo cual reafirmaría la hipótesis del efecto compensatorio frente al acúmulo de colesterol en las LD.

En relación al gen *SLC51B*, codifica a una proteína transportadora de membrana cuya principal acción como se aprecia en la tabla está implicada en el transporte y secreción de ácidos biliares. Tras la intervención dietética se ha visto como la expresión de este gen aumenta con respecto a los controles por lo que se podría deducir que debido a ese acúmulo de colesterol hepático, el hígado de estos animales está intentando depurarlo incrementando la secreción de ácidos biliares para eliminarlo a través de la bilis aumentando por tanto la producción tratándose nuevamente de un mecanismo compensatorio.

El otro gen del metabolismo lipídico es del *ETPPL*. Este gen codifica a la enzima del mismo nombre, Etanolamina fostafo fosfoliasa, cuya acción no es del todo conocida en la NAFLD, sin embargo, se sabe que involucrada en el metabolismo de fosfolípidos y en la síntesis de la fosfatidiletanolamina (National Library of Medicine, n.d.). Se recuerda que la fosfatidiletanolamina es un glicerofosfolípido de membrana constituido por un alcohol (glicerol) al que se encuentran unidos 2 ácidos grasos y un grupo fosfato el cual se encuentra unido a su vez a la etanolamina. Las LD están recubiertas por una monocapa de fosfolípidos que actúa encapsulando un núcleo de lípidos apolares e hidrofóbicos compuestos por TG, colesterol esterificado y ácidos grasos libres. Se podría deducir que a mayor porcentaje de LD, mayor expresión de este gen. Sin embargo, esto no es así, tras la intervención dietética con la dieta esteatósica los cerdos mostraron una disminución de la expresión de este gen. Esta situación podría explicarse aludiendo a la composición nutricional de la dieta, recordando el elevado contenido en ácido palmítico y por la base proteica de caseína, rica en el aminoácido serina.

LGALS3 es un gen con múltiples funciones biológicas tal y como recoge la tabla 4, sin embargo, la inducción a la apoptosis parece una importante en la NAFLD.

Respecto a los parámetros bioquímicos séricos, los cuerpos cetónicos (KB) aumentaron tras la intervención con la dieta esteatósica con respecto a los controles. Este aumento de la cetogénesis podría explicarse en gran medida por el abundante contenido en hidratos de carbono, y particularmente fructosa, que contenía esta dieta esteatósica, la cual es metabolizada exclusivamente por el hígado dando lugar a TG (Loomba et al., 2021). Podría ser que esta cetogénesis que tiene lugar en las mitocondrias del hígado, actúa como una ruta de desbordamiento, de forma que cuando las concentraciones de acetyl-CoA son muy elevadas y se acumula más allá de su capacidad de oxidarse o de su uso para sintetizar ácidos grasos en la DNL, el acetyl-Co A se convierte en cuerpos cetónicos. Estos cuerpos cetónicos pueden estar presentes en baja concentración en individuos sanos, sin embargo, cuando se encuentran muy incrementados pueden indicarnos a cerca de alguna alteración patológica, como es el caso de la NAFLD.

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima relacionada con el metabolismo proteico, que cuando el hígado está afectado es capaz de salir al plasma sanguíneo y por tanto cuantificarla analíticamente. Cuando sus niveles están aumentados puede alertarnos de daño hepático por lo que habitualmente se utiliza como biomarcador de función hepática al igual que ALT, AST o GGT. Tras la intervención dietética los cerdos mostraron niveles aumentados de esta enzima hepática con respecto a la situación inicial.

Se puede afirmar por tanto que los KB combinados con la ALP podrían ser unos biomarcadores para el diagnóstico de la NAFLD, y que podrían por tanto sumarse al arsenal de biomarcadores

utilizados hasta la fecha. Además, se necesitan biomarcadores pueden aparecer alterados en estadios iniciales de la enfermedad. Se debe recordar que existen multitud de patologías o situaciones nutricionales como la diabetes mellitus, la desnutrición... que cursan con un incremento de la cetogénesis, sin embargo, en este caso los niveles incrementados de ALP podrían servir para confirmar la hipótesis de que la etiología de que la hipercetonemia es derivada de la NAFLD, aunque se requeriría más investigación para verificarlo en este modelo.

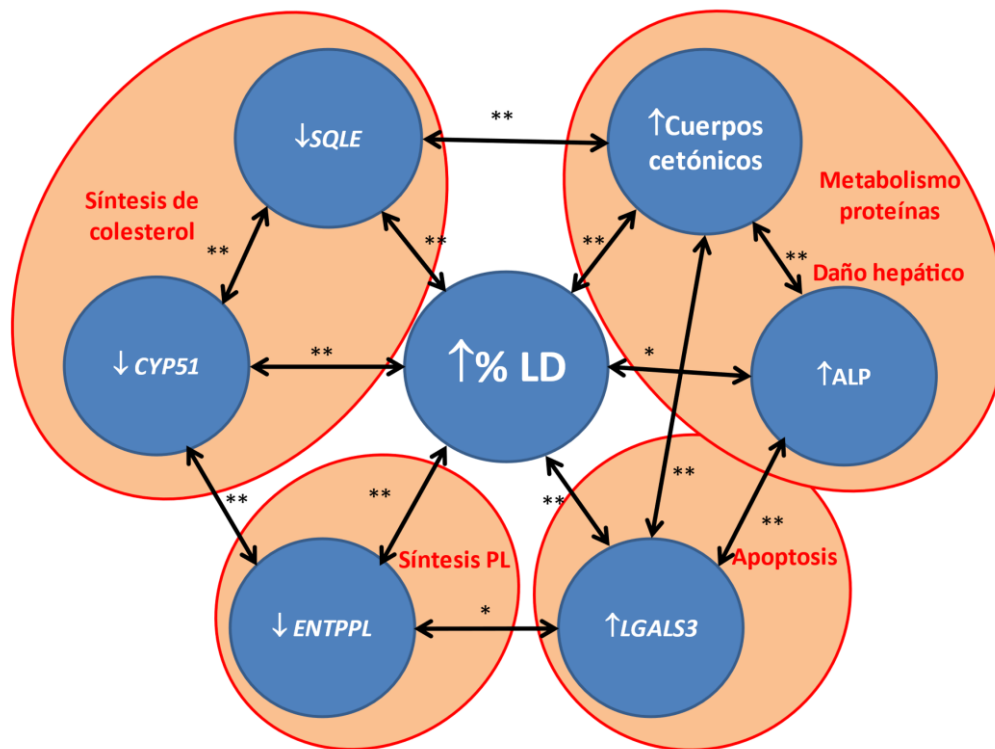


Figura 10. Muestra la correlación del % de LD con genes y parámetros bioquímicos séricos relacionados con síntesis de colesterol, síntesis de fosfolípidos, apoptosis y daño hepático.

6.CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido desarrollar NAFLD en los cerdos empleados como modelo tras 2 meses de intervención dietética, confirmándose este suceso mediante la histología hepática obteniéndose diferencias estadísticamente significativas.

2. Se ha comprobado no solo presencia de NAFLD, sino también de NASH a través de la detección IHQ de niveles elevados de la proteína inflamatoria CD68 tras la intervención. Además, se han caracterizado anatomopatológicamente otras lesiones como balonización de los hepatocitos, fibrosis...

3. Se han encontrado mediante NSG, nuevos genes modulables por la dieta implicados en el desarrollo de NAFLD. Los genes que presentaron un valor de Fold of Change superior a 4,6 fueron: *SPP1*, *MCOLN3*, *SLC51B*, *ATP2B3*, *LOC100520753*, *GPNMB*, *PLP1*, *LOC110257900*, *LPO*, *DCSTAMP*, *ATP6V0D2* y *LGAL3*. Por otro lado, los genes que presentaron un valor de Fold of Change inferior a -2,6 fueron: *MT3*, *NRN1*, *ARG2*, *PEBP4*, *SLC25A25*, *ENTPPL*, *MT1D*, *DCST1*, *SQLE*, *LOC102166944*, *MOXD1* y *NANOS1*.

4. Se han confirmado los resultados de los 3 pooles por condición experimental analizados mediante RNAseq con los resultados de las muestras individuales analizados mediante RT-qPCR, obteniendo un valor de $R^2=0.8193$, que da un valor de R superior a 0,9, por lo que podemos considerar equivalentes los resultados obtenidos por ambas técnicas analíticas.

5. Se ha propuesto el empleo de los cuerpos cetónicos (KB) junto con la fosfatasa alcalina (ALP) como nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de esta enfermedad metabólica hepática.

7. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

- Bassols, A., Costa, C., Eckersall, P. D., Osada, J., Sabrià, J., & Tibau, J. (2014). The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(10), 715–731. <https://doi.org/10.1002/prca.201300099>
- Blas García, A. (2018, January 9). 4.3. Retrotranscripción de ARN - YouTube. Retrieved June 4, 2021, from <https://www.youtube.com/watch?v=TyDwjwUPwO0>
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Charlton, M. R., Burns, J. M., Pedersen, R. A., Watt, K. D., Heimbach, J. K., & Dierkhising, R. A. (2011). Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*, 141(4), 1249–1253. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.061>
- Cos, M. G. (2010). Nuevos métodos de diagnóstico molecular Transcriptómica (mARN y miR). *Gh Continuada*, 9(4), 155–165. Retrieved from https://colombia.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/infografia-2-semana_andina.pdf
- Cubillos, K., Pinilla MSC, G., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 6(9), 65. <https://doi.org/10.22490/24629448.397>
- Day, C. P., & James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology*. W.B. Saunders. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
- Gadea, J., & García-Vázquez, F. A. (2010). Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 106(1), 30–45.
- Gonzalo, M. A., Martínez-Beamonte, R., Palacios, P., Marín, J., Castiella, T., Surra, J., ...

- García-Gil, A. (2012). Analysis of tissue bioimpedance as a measurement of liver steatosis: Experimental model in large animals. *Transplantation Proceedings*, 44(6), 1579–1583. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.05.006>
- Gonzalo Rodríguez, M. A. (2012). Diagnóstico de la Esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental.
- Herrera Marcos, L. V. (2019). Mecanismos moleculares de la esteatosis hepática no alcohólica en diversos modelos animales e influencia de terpenos del aceite de oliva.
- Jamieson, R. W., Zilveti, M., Roy, D., Hughes, D., Morovat, A., Coussios, C. C., & Friend, P. J. (2011). Hepatic steatosis and normothermic perfusion-preliminary experiments in a porcine model. *Transplantation*, 92(3), 289–295. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318223d817>
- Loomba, R., Friedman, S. L., & Shulman, G. I. (2021). Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*, 184(10), 2537–2564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>
- Macías Ceja, D. C. (2017a). 4.1. Extracción de ARN - YouTube. Retrieved June 4, 2021, from <https://www.youtube.com/watch?v=5dXECaf-r0>
- Macías Ceja, D. C. (2017b, December 15). 4.5. Cuantificación de la expresión génica (Método del Ct) - YouTube. Retrieved June 4, 2021, from <https://www.youtube.com/watch?v=n3SZlsoKOoo>
- Martínez Soriano, B. (2017). Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática: modelo experimental.
- National Library of Medicine. (n.d.). National Center for Biotechnology Information. Retrieved June 22, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- National Library of Medicine. (n.d.). ETNPPL ethanolamine-phosphate phospho-lyase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Retrieved June 23, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64850>
- Ortiz Masiá, D. (2017, December 1). 4.2. Cuantificación de ARN - YouTube. Retrieved June 4, 2021, from <https://www.youtube.com/watch?v=gEAFnDFScZs>
- Tapia, C. (2005). Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Medwave*, 2005(4). <https://doi.org/10.5867/medwave.2005.04.3548>
- Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., ... Vos, M. B. (2019). Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic

Steatohepatitis. *Hepatology*, 69(6), 2672–2682. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>